UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LEILA APARECIDA FIGUEIREDO

Nutrição nitrogenada (^{15}N) em soja convencional e transgênica sob aplicação do herbicida glifosato

Piracicaba
2009

LEILA APARECIDA FIGUEIREDO

Nutrição nitrogenada (^{15}N) em soja convencional e transgênica sob aplicação do herbicida glifosato

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Enedi Boaretto

PIRACICABA

2009

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Figueiredo, Leila Aparecida
Nutrição nitrogenada (^{15}N) em soja convencional e transgênica sob aplicação do herbicida glifosato / Leila Aparecida Figueiredo; orientador Antonio Enedi Boaretto. - - Piracicaba, 2009.
83 f.: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Fixação de nitrogênio 2. Hidroponia 3. Isótopos estáveis 4. Nutrição vegetal I. Título

CDU 633.34:631.461.5

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ademir e Neide, pelas oportunidades, incentivo, compreensão e amor dedicados em todas as realizações da minha vida.

Ao meu irmão, Júnior, por estar sempre presente, pela solidariedade e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Ao Prof. Dr. Antonio Enedi Boaretto pela amizade, orientação, auxílio, compreensão e ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Cássio H. Abreu Júnior e Prof. Dr. Takashi Muraoka pela amizade e conhecimentos transmitidos;

Às técnicas do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, Henriqueta e Cleusa, pela contribuição nos trabalhos, pelas conversas e compreensão;

Aos amigos de laboratório Ademir, Carlos, Carol, Denis, Felipe, José Lavres, Lilian, Lúcia, Marcelo, Milton, Thiago, Victor, Vivian, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, conselhos e pelas horas de descontração: minha eterna e sincera amizade;

Aos amigos do CENA: Aline, Anderson, Eduardo, Fernanda, Grazi, Hugo, Iracema, Isabeli, Larissa, Maju, Marcelo, Nádia, Raul, Renato, Robinho, Vinícius e Virginia pelo apoio e amizade;

À Juliana, estagiária que muito ajudou no desenvolvimento do projeto, pela amizade;

Aos estagiários Adriana, Amanda, André, Henrique, Luis;

Aos meus amigos de graduação, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando: Maria Juliana (Anaruxa), Paula (Bell), Ana Paula (Diniña), Henrique (Tama), Jaime (Passariño), Fernanda (Corn), Eduardo (Inguia), Daniele (Pagu), Nebó;

Aos meus amigos da vida toda: Luciane, Patricia, Flávia, Ana Paula S., Ana Paula B., Mônica, Lígia e Bruno;

As funcionárias do CENA: Neuda, Cláudia, Sônia, Alzira, Marilia;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa;

À Embrapa Transferência de Tecnologia, pela cessão das sementes de soja utilizadas para realização do projeto;

À Empresa Microquímica Indústrias Químicas Ltda., pelo inoculante de soja cedido;

Ao Laboratório de Isótopos Estáveis, do CENA/USP, pela determinação isotópica de ^{15}N das amostras;

A toda comunidade do CENA, que propiciam diariamente, agradável convivência;

A toda minha família pelo carinho e apoio recebido;

Meu sincero agradecimento.

RESUMO

FIGUEIREDO, L.A. **Nutrição nitrogenada (^{15}N) em soja convencional e transgênica sob aplicação do herbicida glifosato**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O glifosato é o herbicida mais usado mundialmente em aplicações após a emergência das plantas daninhas, antes da semeadura ou emergência das culturas. Muitos trabalhos têm sido realizados para entender seu modo de ação, mas poucos com a finalidade de estudar seu efeito sobre as populações microbianas do solo, como a população de *Bradyrhizobium japonicum* e a conseqüente ação do produto sobre taxas de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Pouca ênfase também tem sido dada aos efeitos do produto sobre o acúmulo de macronutrientes em variedades de soja. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo estudar a ação do herbicida glifosato sobre a nutrição nitrogenada em soja convencional e transgênica, avaliando, para tanto, acúmulo de nutrientes, nodulação e taxas de FBN, fotossíntese e transpiração. Foram utilizadas as variedades de soja convencional, BRS Conquista e a transgênica, BRS Valiosa. Foram utilizadas as doses 0, 2, 4, 8, 16 e 32μM L^{-1} do herbicida glifosato em solução nutritiva e aplicação foliar. As plantas foram coletadas no estádio R3, época do florescimento pleno e R8, após o enchimento dos grãos e os seguintes parâmetros foram analisados: produção de massa seca, taxas de fotossíntese e transpiração, acúmulo de macro e micronutrientes, nodulação, atividade da enzima nitrogenase e taxa de FBN. Observou-se que a variedade Conquista foi severamente afetada em todos os parâmetros estudados, com exceção das taxas de fotossíntese e transpiração. Na variedade Valiosa observou-se que a produção de massa seca e taxas de fotossíntese e transpiração não foram afetadas; o acúmulo de Cu e Zn sofreu redução com as doses aplicadas do produto em solução, no entanto, não houve resposta para o acúmulo dos demais nutirentes analisados: N,

P, K, Ca, Mg, S, B, Fe e Mn. Houve redução na atividade da enzima nitrogenase no tratamento 32µM L^{-1}, entretanto as taxas de FBN não foram prejudicadas na Valiosa. Concluiu-se que o herbicida glifosato afetou negativamente a variedade Conquista, mas teve pouca ação sobre os parâmetros analisados para a variedade Valiosa.

Palavras- chave: *Glycine max*. Acúmulo de nutrientes. Enzima nitrogenase. FBN.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, L.A. **Nitrogenous nutrition in conventional and transgenic soybean under application of herbicide glyphosate.** 2009. 83f. Dissertação (mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Glyphosate is the most used herbicide throughout the world in post-emergent applications of weed species, before sowing or emergence of the cultures. Many works have been performed to understand the way of action of this herbicide, but few with the purpose to study its effect on the microbial populations of the soil, as the *Bradyrhizobium japonicum* population and the consequent action of the product on Biological Nitrogen Fixation rates (BNF). Little emphasis also has been given to the effect of this product on the macronutrients accumulation in soybean varieties. Thus, the present work aimed to study the action of the ghyphosate on the nitrogenous nutrition in conventional and tolerant soybean, though the nutrients accumulation, nodulation and BNF rates. Two contrast varieties of soybean were tested, one sensitive (BRS Conquista) and one tolerant (BRS Valiosa), in six different doses o the herbicide (0, 2, 4, 8, 16 and 32μM L^{-1}) in nutritional solution and foliar application. The plants were collected in the R3 soybean developmental stage (full bloom) and R8, after grains filing and the following parameters were analyzed: dry mass production, photosynthesis and transpiration rates, accumulation of nutrients, nodulation, nitrogenase activity and BNF rates. It was observed that the variety Conquista was severely affected in all the parameters studied, excepted for photosynthesis and transpiration rates. It was also observed that in the Valiosa variety the dry mass production, photosynthesis and transpiration rates were not affected; the Cu and Zn accumulation was reduced with the application of higher doses of the product in solution, however, the other nutrients (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Fe, Mn) did not show any

difference in accumulation. There was a reduction in the nitrogenase activity in the 32μM L^{-1} treatment, however the BNF rates were not affected in the Valiosa variety. It was concluded that the herbicide ghyphosate had a negative effect in the variety Conquista, but it had little action on the parameters analyzed for the variety Valiosa.

Words key: *Glycine max*. Nutrients accumulation. Nitrogenase. BNF.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de glifosato p.a. utilizadas nos experimentos com soja 41

Tabela 2 - Número de vagens no Experimento 1, nas variedades Conquista e Valiosa, em duas épocas distintas de aplicação do herbicida glifosato 56

Tabela 3 - Taxa de Fotossíntese medida nas folhas de soja, variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução 57

Tabela 4 - Taxa de Transpiração medida nas folhas de soja, variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução 57

Tabela 5 - Acúmulo de nutrientes em soja, nas variedades Valiosa e Conquista 60

Tabela 6 - Acúmulo de N em soja, Experimento 2, nas variedades Valiosa e Conquista 62

Tabela 7 - Teor de N total (%), na parte aérea (folhas) e no caule de plantas de soja, variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução 63

Tabela 8 – Valor SPAD obtido no estádio V3. Experimento 3 64

Tabela 9 - Valor SPAD obtido no estádio V6. Experimento 3 64

Tabela 10 - Número e massa seca dos nódulos no Experimento 2, nas variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução 66

Tabela 11 - Número e massa seca dos nódulos no Experimento 3, nas variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução 67

Tabela 12 - Número de nódulos no Experimento 1, nas variedades Conquista e Valiosa, em duas épocas distintas de aplicação do herbicida glifosato 68

Tabela 13 - Atividade da enzima nitrogenase no Experimento 2, nas variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução 69

Tabela 14 - Taxa da FBN (%), medidas por redução de acetileno no Experimento 2, nas variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução 70

Tabela 15 - Taxa da FBN (%), medidas por determinação isotópica de N no Experimento 3, nas variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução 71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da molécula de glifosato.....23

Figura 2. Rota da degradação do glifosato no solo, formando sarcosina e AMPA.....24

Figura 3. Esquema simplificado das rotas biossintéticas para produção de compostos fenólicos, isoprenóides e alcalóides.....26

Figura 4. Via detalhada do ácido chiquímico.....27

Figura 5. Esquema do processo de FBN que ocorre dentro dos nódulos.....30

Figura 6. Comparação das raízes de soja, variedade Conquista, aos 120 dias, entre a testemunha e o tratamento 5 (32 μM L^{-1} de glifosato em solução nutritiva).....51

Figura 7. Comparação entre as raízes de soja, variedade Conquista e Valiosa, aos 60 dias, sob aplicação de 32 μM L^{-1} de glifosato em solução nutritiva.....53

Figura 8. Comparação entre os trifólios de soja, variedades Conquista e Valiosa, aos 60 dias, sob aplicação de 32 μM L^{-1} de glifosato em solução nutritiva.....54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) no Experimento 2, variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução.....49

Gráfico 2. Massa Seca da Raiz (MSR) no Experimento 2, variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução.....49

Gráfico 3. Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) no Experimento 1, nas variedades Conquista e Valiosa, em duas formas distintas de aplicação do herbicida glifosato.....55

Gráfico 4. Massa Seca da Raiz (MSR) no Experimento 1, nas variedades Conquista e Valiosa, em duas formas distintas de aplicação do herbicida glifosato.....55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1 OCUPAÇÃO MUNDIAL DA SOJA 15
2.2 SOJA TRANSGÊNICA 16
2.3 TRANSGÊNICOS: RISCOS AMBIENTAIS 17
2.4 TRANSGÊNICOS: RISCOS PARA A SAÚDE HUMANA 19
2.5 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL PARA PLANTIO DE TRANSGÊNICOS 21
2.6 MODO DE AÇÃO DO GLIFOSATO 22
2.7 NECESSIDADES NUTRICIONAIS DA SOJA: NITROGÊNIO E FBN 27
2.8 USO DO GLIFOSATO EM SOJA 31
2.9 EFEITOS DO GLIFOSATO EM CULTURAS 33
2.10 DEGRADAÇÃO DO GLIFOSATO 37
3. HIPÓTESES 38
4. OBJETIVOS 39
5. MATERIAL E MÉTODOS 40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
7. CONCLUSÕES 73
REFERÊNCIAS 74

1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da soja geneticamente modificada resistente ao glifosato, tem-se observado aumento considerável na utilização desse herbicida para aplicação após emergência da cultura. Atualmente, o Brasil conta com aproximadamente 90 variedades de soja transgênica de várias empresas de sementes, disponíveis para plantio (OLIVEIRA, et al., 2008). Entretanto, poucos estudos foram desenvolvidos no país sobre os efeitos do glifosato nessas variedades, assim como sobre sua influência na população de microrganismos do solo.

As propriedades que determinam o comportamento do glifosato caracterizam o produto como sendo de reduzido impacto ao ambiente e à saúde. Sabe-se que este é um herbicida de amplo espectro, utilizado tanto em culturas anuais quanto perenes, no entanto, faz-se necessário aprofundar os conhecimentos sobre os efeitos do glifosato sobre a população de microrganismos do solo, além dos possíveis impactos que essas aplicações subseqüentes podem estar ocasionando na fisiologia e nutrição mineral da cultura da soja, tanto convencionais com efeito residual ou de deriva do produto, quanto em plantas transgênicas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do herbicida glifosato sobre a nutrição nitrogenada em soja convencional, BRS Conquista e transgênica, BRS Valiosa, analisando, para tanto, produção de massa seca, taxas de fotossíntese e transpiração, nodulação e a conseqüente influência nas taxas de Fixação Biológica de Nitrogênio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OCUPAÇÃO MUNDIAL DA SOJA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma leguminosa domesticada pelos chineses há 5 mil anos e há 3 mil anos ela se espalhou pela Ásia, onde começou a ser utilizada como alimento. No início do século XX passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. A partir de então houve um rápido crescimento na produção, com o desenvolvimento das primeiras cultivares comerciais (AGROCLUBES, 2001).

A demanda pela soja no mundo está aumentando a cada ano. Esses grãos são usados na fabricação de alimentos para seres humanos, ração animal e biocombustível. Com a finalidade de suprir a necessidade crescente do mercado, o uso de variedades melhoradas que aumentam a produtividade da cultura, precisaram ser estudadas.

Dados fornecidos pelo Conab em 2006 permitiram esclarecer esse ganho na biomassa. Em 1977, foram colhidos por agricultores brasileiros 47 milhões de toneladas de milho, soja e outros grãos. Vinte e sete anos depois, em 2004, numa safra recorde, foram tirados de suas lavouras 120 milhões de toneladas desses mesmos produtos, quase três vezes mais do que o obtido no final dos anos 1970, numa área apenas 27% maior, números que revelaram aumento de produtividade de mais de 155%. O melhoramento genético e o aprimoramento do maquinário empregado no campo tiveram papel importante na obtenção desses resultados.

A Ásia, a América do Norte e a Europa deverão se consolidar até 2020 como os maiores consumidores mundiais de soja e derivados. Entre os outros continentes, merece destaque o aumento de importância alcançado nas lavouras da América do Sul a partir das duas últimas décadas do século passado. A produção mundial de soja na safra de 2007/2008 foi de 220,9 milhões de toneladas, sendo que a produção dos Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, foi de 72,9 milhões de toneladas e do Brasil, segundo maior produtor, 60 milhões de toneladas, valor este que correspondeu a 51% da produção total do grão na

América do Sul. A área total plantada de soja no mundo chegou a 90,8 milhões de hectares na safra de 2007/2008, sendo o Brasil responsável por 21,3 milhões de hectares e a América do Sul, 41,7 milhões de hectares. A produtividade média da soja no Brasil na safra de 2006/2007 foi de 2.823 kg ha^{-1} (EMBRAPA, 2009).

Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior mostraram que a soja tem uma importante participação nas exportações brasileiras. Em 2006 foram US$ 9,3 bilhões, o que representou 7% do total exportado e, em 2008, esse valor se aproximou dos U$$ 11 bilhões, representando 5% do total exportado (EMBRAPA, 2009).

A estimativa de custos de produção da soja por hectare para safra de 2008/2009 foi de R$ 1.585,99 para a soja transgênica, no estado de Santa Catarina e para a soja convencional, uma média de R$ 1.580,90 para o estado do Paraná. (EMBRAPA, 2009). Esses valores mostraram que para o produtor, custos de produção não é um problema quando há a opção pelo plantio de uma variedade convencional ou transgênica.

2.2 SOJA TRANSGÊNICA

Avanços na biotecnologia resultaram na criação de variedades de soja resistentes ao glifosato, conhecidas como soja RR (Roundup Ready), proporcionando o uso deste herbicida na cultura com reconhecida eficácia e amplo espectro de controle de plantas daninhas.

A primeira planta transformada pela tecnologia do DNA recombinante foi desenvolvida no início da década de 80. Desde então, moléculas de DNA passaram a ser inseridas em espécies de interesse, produzindo novas e desejadas particularidades (DUNFIELD; GERMIDA, 2004; SANTINONI, 2008). Esse é um processo mais rápido e preciso que o melhoramento convencional, pois permite a introdução de um único gene e modificação de uma característica específica. As primeiras plantações comerciais de

transgênicas foram utilizadas na China no início da década de 1990 (AZEVEDO et al., 2000), desde então, essas plantações vêm aumentando.

2.3 TRANSGÊNICOS: RISCOS AMBIENTAIS

A comercialização dos transgênicos é uma questão polêmica, pois ainda há dúvidas sobre os impactos ambientais que o seu uso pode acarretar. Diversos autores divergiram sobre os possíveis perigos, alguns concordaram que o impacto ambiental foi menor com o uso de plantas resistentes a herbicidas, pois o uso de moléculas diferentes para combate às plantas daninhas foi menor e os custos para combate dessas também diminuiu. Entretanto, outros autores apontaram alguns possíveis riscos, tais como: deriva de herbicida para vegetação suscetível e sua ação em organismos não-alvo, fluxo gênico ou poluição genética, exposição de espécies a novos patógenos ou agentes tóxicos, geração de plantas daninhas ou pragas resistentes, efeitos nos ecossistemas e a interrupção da ciclagem de nutrientes e energia, além de que o uso dos transgênicos reduz a diversidade genética da espécie em questão (TIEDJE et al., 1989; FONTES et al., 1996; RISSLER; MELON, 1996; HO et al., 1998; NODARI; GUERRA, 2001; SANTINONI, 2008).

No entanto, também há as vantagens das culturas resistentes a herbicidas, como: grande facilidade para resolver problemas de manejo de plantas daninhas após a emergência da cultura, maior facilidade para os produtores adotarem técnicas de manejo integrado ou dar continuidade ao manejo quando o controle cultural ou mecânico não forem eficientes, vantagens econômicas para os produtores, já que as culturas resistentes diminuem os prejuízos causados pela deriva de herbicidas, maior segurança para o ambiente, pois se usaria um menor número de herbicidas em campo (BURNSIDE, 1992; LYSON, 2002; MONQUERO, 2005). Apesar de todas as vantagens trazidas pela aplicação do glifosato, depender de um único herbicida ano após ano pode acelerar a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes e

espécies tolerantes. Entretanto, seria necessário estudar cada caso, analisando as vantagens e desvantagens do uso dos transgênicos, sem generalizações.

Outro risco ao ambiente que a cultura transgênica poderia causar seria a transferência vertical de genes, mas sabe-se que a soja cultivada é essencialmente autopolinizadora. Para que ocorra hibridação intraespecífica seria necessário haver proximidade entre as plantas, que o florescimento fosse coordenado e o pólen móvel, viável e compatível com os tecidos maternais (DYER et al., 1993; MONQUERO, 2005). As anteras amadurecem no botão floral e polinizam-se diretamente no estigma da mesma flor. A polinização cruzada geralmente é muito baixa e diversos estudos vêm demonstrando que ela se situa entre 0,03 e 3,62% (MCGREGOR, 1976; WOODWORTH, 1992). Em distâncias superiores a 4,5 metros da fonte de pólen, a polinização cruzada natural na soja é rara (inferior a 0,02%), portanto é difícil a ocorrência da fecundação cruzada entre variedades de soja convencional e transgênica. No entanto, há relatos de transferência horizontal de genes para a cultura da soja, ocorrendo a formação de híbridos entre variedades transgênicas e plantas aparentadas e/ou daninhas (SANTINONI, 2008), mas para essas se tornarem uma ameaça, como uma planta invasiva, os híbridos precisariam ser viáveis e competitivos, além de férteis quando dependem da reprodução sexual para propagação. Com base no que se conhece hoje, nem todos os híbridos são viáveis (WOLFENBARGER; PHIFER, 2000). Para Galli e Montezuma (2005), a soja cultivada é sexualmente compatível somente com os membros do gênero *Glycine.* Ainda, em relação às preocupações com o fluxo gênico da soja transgênica, deve-se considerar que a espécie foi introduzida no Brasil e não apresenta a matriz silvestre relacionada com a qual possa cruzar. De acordo com Ellstrand (2003), pelo menos 80% das variedades de soja cultivadas mundialmente são oriundas de países onde não existe risco de hibridação.

2.4 TRANSGÊNICOS: RISCOS PARA A SAÚDE HUMANA

O glifosato é uma das moléculas herbicidas mais estudadas mundialmente em termos de segurança ambiental e saúde humana, possuindo uma das maiores bases de dados solicitados à liberação do produto no mercado no que diz respeito aos pesticidas. No entanto, alguns trabalhos indicam que o glifosato pode não ser tão seguro para a saúde humana. Seria essencial que respostas quanto a sua segurança fossem dadas antes do seu uso em larga escala em áreas onde está sendo introduzida a soja transgênica, sem influência das empresas produtoras das variedades e herbicidas.

Os riscos associados aos transgênicos para a saúde humana são decorrentes da premissa de que as modificações genéticas efetuadas nas plantas as levam a produzir substâncias ausentes ou incomuns nos alimentos convencionais. Compostos inexistentes na cadeia alimentar produzidos pelas plantas transgênicas poderiam desencadear processos alérgicos ou outras disfunções fisiológicas (LEITE, 2007; SANTINONI, 2008). A proteína EPSPs está presente em todas as plantas e microrganismos, sendo assim, todos os organismos que se alimentam de plantas e/ou microrganismos têm sido historicamente expostos a essa proteína (GALLI; MONTEZUMA, 2005). Para a Monsanto, a proteína CP4 EPSPs não tem potencial de toxicidade aguda para mamíferos, pois ela é digerida prontamente nos fluidos gástricos e intestinais *in vitro* e advém de uma família de proteínas com um histórico de consumo seguro e nenhum mecanismo biologicamente plausível de toxicidade em animais.

Muitos trabalhos evidenciaram que o princípio ativo do herbicida glifosato é seguro, mas os surfactantes usados em formulações comerciais são tóxicos. A Monsanto declara que estudos com esse herbicida têm sido feitos e que o princípio ativo é pouco tóxico. Não foi constatado efeitos de toxicidade em animais. A Companhia também declarou que estudos em animais provaram que o glifosato não causou câncer, nem teve efeitos em embriões, nem efeitos mutagênicos e neurotóxicos, tampouco efeitos relacionados à reprodução, não causou

alergias e os dados laboratoriais comprovaram que a meia-vida do glifosato no estômago foi de 15 segundos. No entanto, há indícios que exposições acidentais ou intencionais ao longo do tempo causariam envenenamento em humanos e animais, como foi constatado que, em doses baixas, o herbicida provocou inflamação na mucosa do estômago (BUFFIN et al., 2001). Ressaltou-se ainda que a alta solubilidade do glifosato formulado em água e baixa solubilidade em lipídios sugerem que ele não deve se bioacumular (TAVARES, 2005).

Para Galli e Montezuma (2005), estudos demonstraram que a soja RR foi tão segura quanto a soja convencional com respeito à segurança dos alimentos humanos, rações e meio ambiente. No Brasil esse produto foi liberado para uso comercial pelo IBAMA, MAPA e ANVISA.

De acordo com Monquero (2005), para a avaliação da segurança alimentar é fundamental que os alimentos derivados de transgênicos sejam comparados com seus análogos convencionais. Esse foi o principal critério utilizado para avaliar a segurança alimentar e que levou a elaboração do conceito de equivalência substancial (ES) (IFT EXPERT REPORT, 2000). Dentre os requisitos para se estabelecer a segurança de produtos transgênicos, avaliam-se especialmente o potencial alergênico de uma nova proteína expressa, a termoestabilidade, a digestibilidade no meio gástrico ou intestinal, a análise bioquímica de taxas de glicolização, a análise de seqüências de aminoácidos da nova proteína comparativamente à de alergênicos convencionais, a toxicidade da proteína expressa pelo gene introduzido ou metabólito, os efeitos secundários da inserção do gene e o risco de possíveis mutagêneses (CTNBIO, 2002).

Para Galli e Montezuma (2005), a soja RR teve a mesma equivalência nutricional que soja convencional, dados demonstrados pela análise dos nutrientes-chave, composição de aminoácidos e ácidos graxos.

2.5 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL PARA PLANTIO DE TRANSGÊNICOS

Em 1995, o Congresso Nacional aprovou uma lei exemplar, a Lei 8.974/95, que estabeleceu os princípios gerais da biossegurança no Brasil. O seu princípio geral, comum à legislação dos demais países, é que ao se tratar da liberação no ambiente de OGM (Organismo Geneticamente Modificado), a avaliação e o controle de risco devem ser feitos caso a caso através de análises científicas (BERVALD, 2006). A Lei de Biossegurança estabeleceu a criação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, a CTNBio, que vinculada ao Ministério da Ciência e Tecnologia regulamenta a manipulação, cultivo, transporte, comercialização, consumo, liberação e descarte de OGMs, visando proteger a vida, a saúde e o bem estar do homem, dos animais e do ambiente .

O questionário técnico a ser respondido para a CTNBio para que haja a regulamentação de um OGM é composto por questões centrais e específicas, dependendo do tipo de OGM a ser liberado. Entre essas questões pode-se citar: informações a respeito do organismo a ser liberado, a origem do DNA inserido, habitat e ecologia do organismo. São exigidas também informações sobre o mapa genético da construção, a caracterização da modificação genética, os dados sobre estabilidade do organismo e os mecanismos de fluxo gênico, as informações sobre plantas e os microrganismos que vivem associados a este OGM, os microrganismos utilizados como vacina de uso veterinário, os microrganismos que modificam propriedades do solo, entre outras. Somente após a análise dessas informações e dados técnicos fornecidos pela CTNBio é que o OGM poderá ou não ser liberado no ambiente e, mesmo após a liberação da CTNBio, o projeto ainda passará pelas exigências dos Ministérios da Agricultura, Saúde e Meio Ambiente (CTNBio, 2002).

Em março de 2005, o Presidente da República Luiz Inácio Lula da Silva finalmente sancionou a nova Lei de Biossegurança (Lei 11.105, de 24/3/2005), que regulamenta definitivamente o plantio e a comercialização das variedades transgênicas. O texto final

aprovado afirma que toda e qualquer empresa que desejar plantar e/ou comercializar uma variedade transgênica necessita submeter um pedido à CTNBio, que deverá emitir seu parecer. A nova lei retira a obrigatoriedade de realização de estudos de impactos ambientais e sobre a saúde humana, cabendo à CTNBio solicitá-los ou não. (GREENPEACE, 2005). Esta lei ainda dispõe sobre pesquisas e plantios dos transgênicos, os quais só podem ocorrer se observados os princípios de precaução para a proteção do meio ambiente.

A preocupação com a segurança da nova biotecnologia está inserida em acordos internacionais, como a Agenda 21 e a Convenção da Diversidade Biológica (CDB), negociados durante a Conferência das Nações Unidas para o Desenvolvimento e o Meio Ambiente, realizada no Rio de Janeiro em 1992 e ratificada por 170 países. O texto da CDB reconhece o valor da biodiversidade e o direito soberano dos países sobre seus recursos genéticos, ficando responsáveis pela sua preservação e uso sustentável (LEITE, 2007; SANTINONI, 2008).

Em março de 2007 foi decretada a Lei 11.460, a qual dispõe sobre o plantio de OGMs em unidades de conservação. Esta lei veta qualquer atividade, tanto de pesquisa quanto de cultivo de OGMs, nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação, em áreas onde há o registro de ocorrência de ancestrais diretos e parentes silvestres ou em áreas com situações de risco do OGM à biodiversidade.

2.6 MODO DE AÇÃO DO GLIFOSATO

O glifosato, cuja estrutura é mostrada na Figura 1, foi sintetizado em 1964 como potencial quelante industrial e seu uso como herbicida foi descrito apenas em 1971. A ANVISA dispõe a ficha técnica da molécula:

Nome químico: N-(phosphonomethyl)glycine;

Fórmula bruta: $C_3H_8NO_5P$;

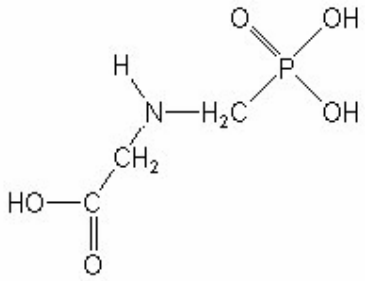

Figura 1. Fórmula estrutural da molécula de glifosato.

O glifosato é um herbicida sistêmico, não-seletivo, de amplo espectro, pertencente à classe dos derivados do aminoácido glicina. Controla plantas mono e dicotiledôneas anuais e perenes, de folhas largas ou estreitas, sendo, portanto, uma das melhores opções para o manejo dessas plantas. Este herbicida é utilizado extensivamente, sendo aplicado após a emergência das plantas daninhas, antes da semeadura ou emergência das culturas (TREZZI et al., 2001). Com o desenvolvimento de plantas tolerantes a esse herbicida, ele também passou a ser usado após a emergência da cultura de interesse econômico. É muito solúvel em água (900.000 mg L^{-1}), apresenta baixa volatilidade e baixo coeficiente de partição octanol/água (k_{ow} = 0,019), indicando reduzida afinidade por lipídios.

A toxicidade aguda do produto, causada por uma única dose, é considerada baixa e esse fato pode ser atribuído à modalidade bioquímica de ação do glifosato em um caminho metabólico nas plantas (chamado mecanismo do ácido chiquímico), similar ao existente em alguns microrganismos mais complexos não existindo, entretanto, em animais. A toxicidade crônica, resultado da exposição contínua ao agrotóxico, também é considerada baixa, sendo o maior problema o perigo da resistência adquirida (AMARANTE-JR et al., 2002).

A degradação do glifosato no solo pode seguir duas rotas. A primeira consiste na transformação do glifosato em sarcosina por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges*. A sarcosina entra no metabolismo destes microrganismos e de outros, degradando-se. Esta rota é, no entanto, pouco citada na literatura. A segunda rota consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA) (Figura 2).

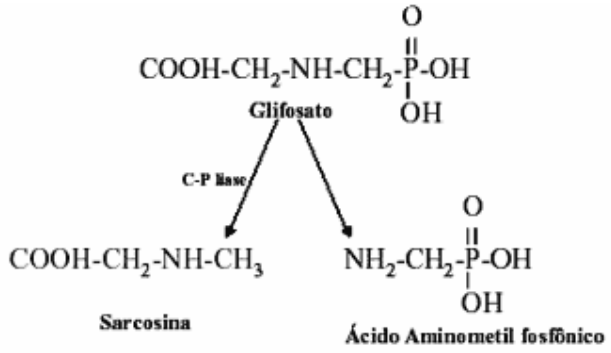

Figura 2. Rota da degradação do glifosato no solo, formando sarcosina e AMPA.

A liberação do glifosato pode ser feita diretamente no solo pelas raízes das plantas, por meio da exsudação. As proteínas produzidas têm a oportunidade de interagir com a comunidade microbiana durante todo o período de crescimento da cultura. A partir disso, esses componentes podem ser absorvidos, integrados e replicados pela microbiota, sofrer desnaturação química ou física, serem degradados por heterotróficos, ingeridos pela fauna epigênica ou permanecerem adsorvidos aos colóides do solo (DUNFIELD; GERMIDA, 2004; SIQUEIRA et al., 2004; SANTINONI, 2008).

A enzima EPSPs é específica no metabolismo dos aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano (MOUSDALE; GOGGINS, 1991; COBB, 1992; TREZZI et al., 2001). Com a inibição desta enzima, a planta não produz os aminoácidos para a síntese de proteínas (PADGETTE et al., 1995) e alguns metabólitos secundários,

acumulando um composto intermediário, o chiquimato (VIDAL, 1997), o qual provoca um colapso no metabolismo intermediário dos tecidos vegetais. Inicialmente, a enzima EPSPs liga-se ao chiquimato-3-fosfato (S3P), formando o complexo EPSPs-S3P, na seqüência o fosfoenolpiruvato (PEP) é encaixado nesse complexo, produzindo 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP). Em plantas suscetíveis tratadas com glifosato, a molécula do herbicida não se liga à enzima livre, mas ao complexo $EPSP_S$-S3P, impedindo a ligação do PEP, formando o complexo inativo EPSPs-S3P-glifosato (TREZZI et al., 2001; MONQUERO, 2003). Nas plantas a $EPSP_S$ é sintetizada no citoplasma sendo transportada ao cloroplasto em forma de pré-enzima (pEPSPs). A ligação e inibição do glifosato à enzima também acontece no citoplasma, formando o complexo glifosato-pEPSPs-S3P (KRUSE et al., 2000). Portanto, há redução na eficiência fotossintética e menor produção de aminoácidos aromáticos (TREZZI et al., 2001). Estima-se que 35% ou mais da massa seca deriva da via do chiquimato e que 20% do carbono fixado siga essa rota metabólica (GAZZIERO; PRETE, 2004). O ponto final da rota do ácido chiquímico é a formação do corismato, a partir do qual muitos metabólitos secundários são formados. Entre esses tem-se tetrahidrofolato (THF), ubiquinona e vitamina K, que são essenciais para a vida da planta. A fenilalanina, além de participar da biossíntese de proteínas, é também substrato para a via do fenilpropanóide, o qual produz numerosos produtos secundários de plantas, tais como antocianinas, lignina, promotores e inibidores de crescimento e compostos fenólicos. Muitos destes metabólitos secundários estão envolvidos na defesa da planta contra doenças e pragas. O triptofano é precursor do ácido indolacético (AIA), hormônio vegetal necessário para a expansão celular, manutenção da dominância apical e muitos outros processos regulatórios (DEVINE et al., 1993; GRUYS; SIKORSKI, 1999; YAMADA et al., 2007).

Na Figura 3 observa-se a rota biossintética para a produção dos metabólitos secundários (CASTRO et al., 2001). Visualiza-se a rota do ácido chiquímico e a formação de

aminoácidos aromáticos, que poderiam ser afetados pelo herbicida glifosato. Em seguida, na Figura 4, detalhes da rota do ácido chiquímico (Mathews; van Holde, 1990; Pereira, 2005).

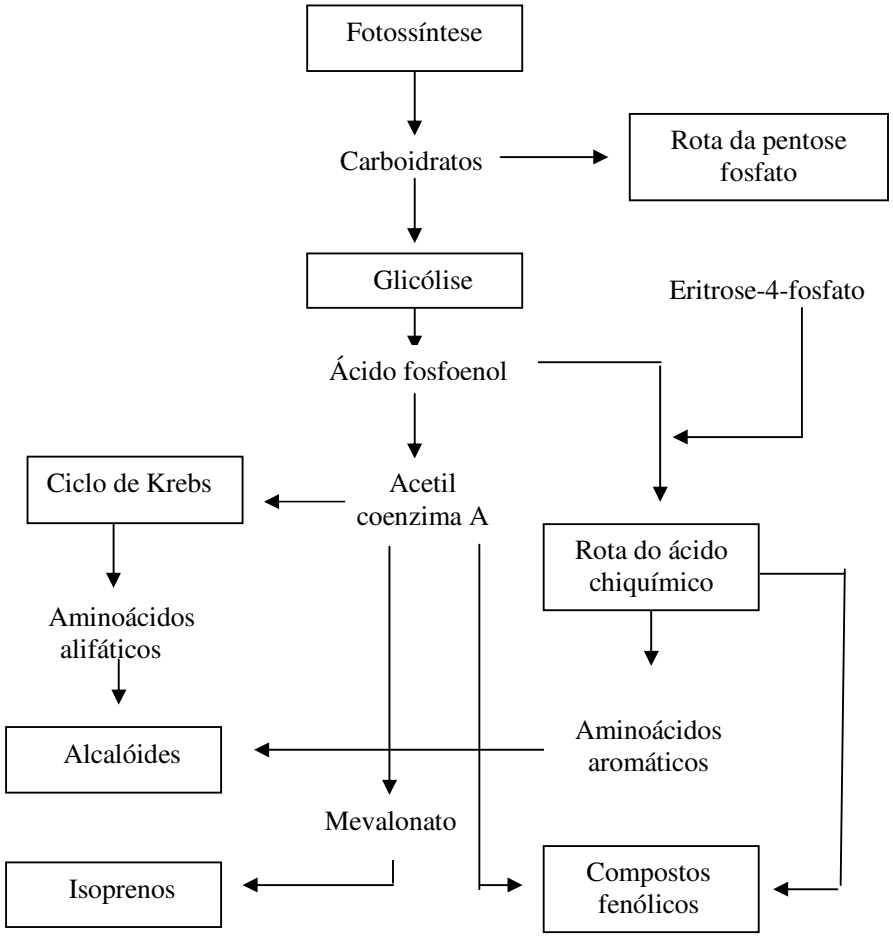

Figura 3. Esquema simplificado das rotas biossintéticas para produção de compostos fenólicos, isoprenóides e alcalóides. (CASTRO et al., 2001).

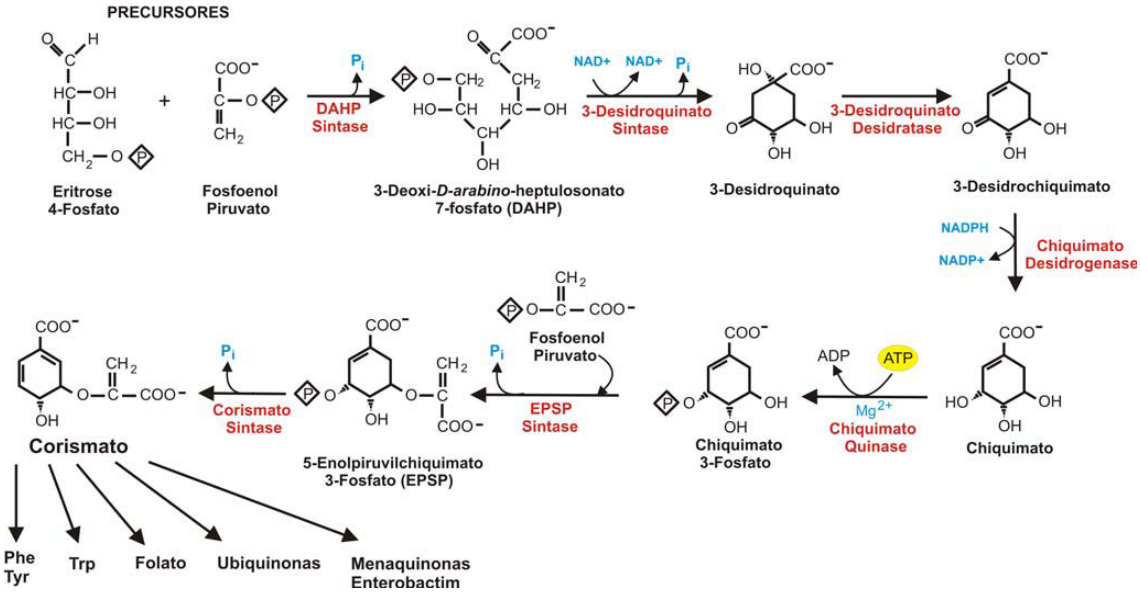

Figura 4. Via detalhada do ácido chiquímico (Mathews; van Holde, 1990; Pereira, 2005).

Quanto mais glifosato a planta recebe, mais ácido chiquímico ela acumula, causando a morte desta. No entanto, já se sabe que apesar da rota do chiquimato estar presente em plantas e em muitos microrganismos, ela é completamente ausente em mamíferos, peixes, aves, répteis e insetos. Essas formas de vida não dependem da rota do ácido chiquímico porque retiram da dieta os produtos aromáticos que necessitam. Já as plantas são obrigadas a produzir estes aminoácidos essenciais para sobreviver e se multiplicar (GRUYS; SIKORSKI, 1999).

2.7 NECESSIDADES NUTRICIONAIS DA SOJA: NITROGÊNIO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O elemento mais requerido e mais limitante à cultura da soja, em uma produção comercial, é o nitrogênio (N). No Brasil o N é obtido, em parte do solo (25% a 35%) e, na maior parte, pela fixação simbiótica do nitrogênio (65% a 85%). O uso de adubo nitrogenado poderia representar um elevado custo para o sistema de produção. Além disso, este nutriente tem efeito poluente quando não bem manejado e sua eficiência como fertilizante é de 50%-70% de aproveitamento pelas plantas. Neste aspecto, a Fixação Biológica de Nitrogênio

(FBN) derivada da associação simbiótica entre plantas e bactérias específicas do solo é o processo mais significativo de adição de N no ecossistema terrestre (COÊLHO, 2006). As bactérias fixadoras interagem com as raízes de leguminosas, formando nódulos; essa interação ocorre aproximadamente 2 h após o contato da bactéria com as raízes. Os nódulos primários se desenvolvem em regiões de alongamento e nas zonas de formação de pequenos pelos radiculares. Esses são formados pelos seguintes passos:

1 - Crescimento dos pelos radiculares;

2 - Os pelos radiculares exsudam compostos específicos (flavonóides-antocianinas) para atrair as bactérias para as raízes e induzir especificidade através do gene *nod* da bactéria (nodulação);

3 - As bactérias simbiontes atracam na superfície do pelo radicular;

4 - Durante o contato, as células dos pelos liberam fatores de nodulação (Nod) causando seus enrolamentos;

5 - A bactéria digere a parede celular e forma o cordão de infecção para dentro do córtex da raiz, onde penetram e se multiplicam intensamente, ocorrendo também intensa divisão celular das células corticais que se exteriorizam, formando o nódulo. Nesse momento as bactérias param de se dividir e começam a aumentar em tamanho e a se diferenciar em organelas endossimbióticas fixadoras de N, denominadas bacteróides;

6 - Os nódulos radiculares desenvolvidos possuem uma organização própria de tecidos. Eles apresentam um meristema responsável pela formação das células da região de invasão, uma região central e conexões vasculares com o xilema do cilindro central da raiz. Envolvendo e delimitando toda essa estrutura está o parênquima do nódulo.

O benefício desta associação para a planta é fundamental para o seu desenvolvimento, pois é por meio desta interação que acontece a conversão do N_2 atmosférico em compostos orgânicos (como a asparagina e a glutamina) essenciais à nutrição da planta. Assim, a FBN

representa o ponto chave do ingresso do nitrogênio molecular no ciclo biogeoquímico do nitrogênio.

No Brasil, a FBN foi adotada como opção para adubação nitrogenada da soja desde os primórdios do seu cultivo, no início dos anos 50. A economia anual do setor agrícola com a substituição do uso de adubos nitrogenados pelos inoculantes foi da ordem de U$$ 2 bilhões (YAMADA et al., 2007). Em soja, a FBN é realizada pela simbiose com bactérias das espécies *Bradyrhizobium japonicum, Bradyrhizobium elkanii* ou ambas.

O mecanismo da fixação é expresso através da seguinte reação:

$$N_2 + 8\ e^- + 8H^+ + 16\ ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2^+ + 16\ ADP + 16\ Pi$$

O complexo da enzima nitrogenase fixa o N_2. Para que a reação ocorra é necessário que haja um transporte de elétrons, mediado por moléculas aptas a realizá-lo. A nitrogenase é formada por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe - proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons. Durante a reação de redução do N_2, a nitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferridoxina (MORGANTE, 2008). Para que ocorra a FBN é necessário que a nitrogenase se encontre em condições anaeróbicas.

Para Malavolta et al. (1997), a simbiose é na verdade uma troca de favores entre a leguminosa e as bactérias, a primeira fornecendo carboidratos para as bactérias fixadoras e essas, fixando o N_2, fornecem aminoácidos e amidas, que são transportadas para a planta pelo xilema, durante o processo de respiração. Em resumo, o processo de fixação simbiótica de N_2 pode ser dividido nos seguintes passos (Figura 5):

1- Prótons do carboidrato são transferidos para o N, formando NH_3;

2- Elétrons também do carboidrato são levados à proteína II (ou azoferredoxina) por intermédio da ferredoxina (substituída pela flavodoxina em sistemas anaeróbicos);

3- O ATP (+ Mg) fornece a energia necessária para a redução do N_2 a NH_3;

4- O NH_3, em contato com o substrato aquoso do citoplasma dos bacteróides, é transformado em NH_4^+;

5 - As enzimas glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) convertem o NH_4^+ em aminoácidos.

O principal meio de transporte de nitrogênio dos nódulos da soja para a parte aérea é na forma de ureídeos, além da asparagina (KING; PURCELL, 2005; FAGAN, 2007).

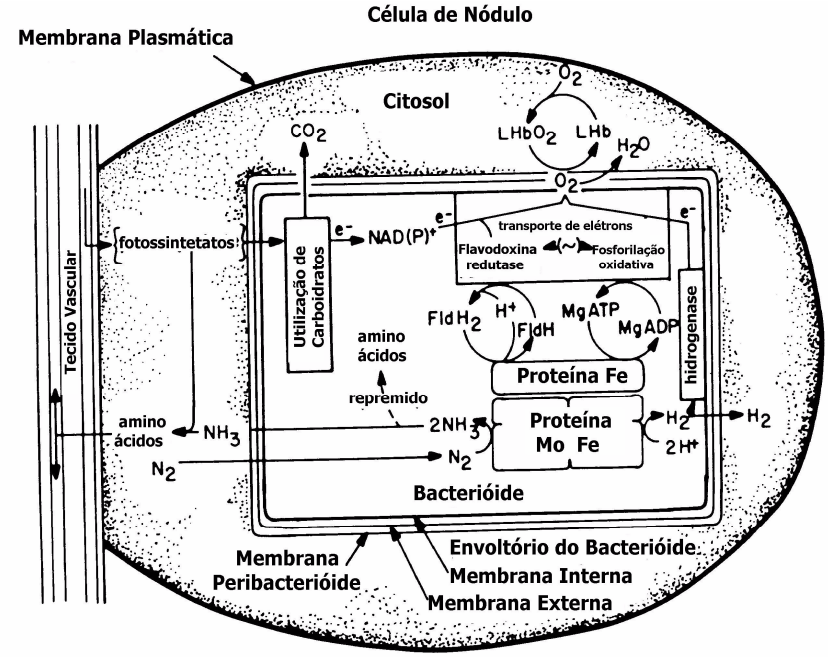

Figura 5. Esquema do processo de FBN que ocorre dentro dos nódulos (www.ufra.edu.br/cursosgraduacao/agronomia/roberto/Apresentacoes/Metabolismo%20e%20Fixacao%20do%20Nitrogenio.ppt).

A fixação do nitrogênio atmosférico aparece normalmente entre 3 e 5 semanas após a semeadura de espécies de leguminosas. O N que supre as plantas até então é oriundo das sementes e do solo. A demanda desse elemento nesta fase é baixa. O processo de fixação de N atinge seu ponto máximo no estádio de floração plena e declina a partir do preenchimento dos grãos, participando no suprimento de N durante todo o ciclo da soja. Para o Brasil a ameaça a esse processo de fixação é muito mais grave que para os EUA, pois as variedades brasileiras foram desenvolvidas para maximizar a FBN, enquanto que nos EUA há uma dependência muito maior do uso de fertilizantes nitrogenados.

2.8 USO DO GLIFOSATO EM SOJA

A soja tolerante ao glifosato apresenta dupla expressão da enzima EPSPs, uma original da própria espécie da soja e outra da espécie da *Agrobacterium* sp., estirpe CP4. A *Agrobacterium* sp. codifica uma variante da EPSPs, a enzima CP4 EPSPS, que não é afetada pelo herbicida (KLEBA, 1998; SANTOS 2007). Assim sendo, o glifosato interfere na rota metabólica da enzima EPSPs, trazendo efeitos negativos para a soja convencional, mas não interfere na rota da enzima CP4 EPSPS.

Sob tratamento com esse herbicida, as plantas de soja não são afetadas, em virtude da ação continuada e sistemática dessa enzima alternativa (CP4 EPSPS), insensível ao produto. Todavia as bactérias fixadoras de N_2, associadas ao sistema radicular da soja, do gênero *Bradyrhizobium*, não apresentam essa insensibilidade enzimática e o herbicida pode interferir na interação simbiótica. Segundo Gonzalez et al. (1996), o risco de intoxicação de microrganismos a herbicidas foi maior quando os produtos inibiram processos bioquímicos comuns entre as plantas e os microrganismos.

Por causa dessa sensibilidade dos rizóbios ao herbicida, Kishinevsky (1988) e Malkones (2000) concluíram que a redução do crescimento das estirpes de

Bradyrhizobium sp. na presença do equivalente ácido e das formulações comerciais do glifosato provavelmente ocorreram por causa da inibição da atividade da enzima EPSPsintase e a conseqüente redução da síntese de aminoácidos aromáticos nas células bacterianas. No entanto, para King et al. (2001) e Santos et al. (2004), a sensibilidade do *Bradyrhizobium* sp. ao glifosato foi influenciada pela concentração do herbicida e pela estirpe da bactéria. Há indícios de que o glifosato poderia provocar intoxicação em estirpes de rizóbios e prejudicar a nodulação da soja (HERNANDEZ et al., 1999; KING et al., 2001). No entanto, a maioria dessas evidências é descrita a partir de ensaios em que essas estirpes foram colocadas diretamente em contato com o herbicida.

Diversos autores discordam em relação ao efeito do glifosato sobre a população microbiana do solo. O processo de fixação pode ser afetado pela aplicação de glifosato de forma direta por danos às bactérias simbiontes, ou indireta, por afetar a fisiologia da planta hospedeira, reduzindo a eficácia do processo de fixação/absorção. No entanto, ao contrário, para Galli e Montezuma (2005), no ambiente agrícola o glifosato não causou impacto significativo sobre as populações microbianas em função da grande diversidade dos microrganismos, da composição físico-química dos solos e da dose efetiva para exercer alguma ação sobre eles. Grossbard e Harris (1979) observaram que concentrações de glifosato capazes de inibir microrganismos em culturas puras estão geralmente muito acima daquelas que poderiam estar disponíveis nos solos após as aplicações no campo. Os autores citaram ainda que o glifosato foi altamente adsorvido aos colóides do solo, o que colabora para sua inativação e indisponibilização. Além disto, a população de microrganismos poderia adaptar-se à aplicação do produto, tornando-se pouco sensível à sua presença, sendo capaz de crescer satisfatoriamente, mesmo em concentrações elevadas.

Moorman (1986) não observou redução no crescimento do *Bradyrhizobium japonicum* na presença de glifosato quando aminoácidos aromáticos foram adicionados ao meio de

cultura. Já Mallik et al. (1985) constataram que, em muitos países, o glifosato provocou intoxicação em estirpes de rizóbio e prejudicou a nodulação de leguminosas, inclusive na soja. Zablotowicz e Reddy (2004) concluíram que, apesar de constatados os efeitos deletérios do glifosato sobre *B. japonicum*, a magnitude dos danos não foi ainda medida em condições de campo. Vários autores estão de acordo que, dos herbicidas mais utilizados na agricultura, o glifosato é o menos tóxico para a nodulação e FBN (MALIK; TESFAI, 1985; EBERBACH; DOUGLAS, 1989; SANTINONI, 2008).

A tecnologia dos transgênicos rapidamente se desenvolveu e ganhou espaço, mas até o momento, poucos estudos foram desenvolvidos para avaliar o impacto das técnicas que usam o glifosato sobre a FBN na soja.

2.9 EFEITOS DO GLIFOSATO EM CULTURAS

2.9.1 Na produtividade

Há relatos de redução no crescimento e na produtividade das culturas onde houve aplicação de glifosato, assim como houve necessidade do aumento no uso de fungicidas e inseticidas, houve inibição da FBN e ocorrência de sintomas de deficiências de micronutrientes (CAKMAK, 2007).

Duke (1981) sugeriu que o glifosato poderia aumentar os níveis de etileno nas plantas e, conseqüentemente, causar inibição de crescimento dessas. Outro efeito do glifosato foi aumentar a quantidade de eletrólitos das plantas submetidas ao tratamento com o herbicida, mudando a permeabilidade da membrana plasmática através da possível hidrólise do carboidrato armazenado, comprometendo a formação da parede celular.

2.9.2 Na absorção de nutrientes e na FBN

Há duas deficiências nutricionais particularmente importantes em soja sob a ação do glifosato: a de manganês (Mn) e a de ferro (Fe) (CAKMAK, 2007).

A deficiência de Mn no tecido e o estresse por seca podem aumentar a concentração de ureídeos na parte aérea, sinalizando às bactérias simbióticas que parem com a FBN (GORDON, 2007). Os flavonóides nos extratos radiculares das leguminosas, estimulam a expressão do gene da nodulação portanto, quando o glifosato inibe a formação de flavonóides, está diminuindo diretamente a FBN.

O glifosato provoca mudanças no equilíbrio microbiológico do solo e afeta a população de organismos benéficos para as plantas. Assim, se o produto for utilizado por vários anos, a nodulação das raízes das leguminosas é comprometida e conseqüentemente a FBN, assim serão necessários muitos anos para restabelecer o equilíbrio da microflora e da população normal de *Rhizobium* (HUBER, 2007).

Muitos estudos indicaram que todos os casos de inibição de crescimento foram reversíveis, mas em sistemas como raízes e suspensão de células, a reversão do tratamento foi mais crítica que em sistemas celulares como bactérias e algas.

2.9.3 Nos órgãos das plantas

Os sintomas comuns observados nas plantas não resistentes após a aplicação de glifosato são clorose foliar seguida de necrose. Outros sintomas foliares são: enrugamento ou malformações (especialmente nas áreas de rebrotamento), necrose de meristema, de rizomas e estolões de plantas perenes. Os sintomas fitotóxicos de danos pelo glifosato geralmente desenvolvem-se lentamente, podendo demorar vários dias antes dos primeiros sintomas aparecerem (YAMADA; CASTRO 2007).

A clorose ocorre porque há redução no teor de clorofila, em conseqüência da desintegração dos granas, da degradação da clorofila ou mesmo da menor síntese dessas pelo efeito do glifosato, havendo subseqüentemente, o desaparecimento de amido e proteínas, acelerando o processo de senescência (YAMADA; CASTRO, 2007).

2.9.4 Nos hormônios

Os níveis de auxinas, citocininas e etileno estão associados à nodulação em leguminosas e possuem efeito regulatório pronunciado na divisão e expansão celular (SCHIMIDT, 1999; NUKUI, 2000; FEI; VESSEY, 2004; FAGAN 2007). A divisão celular é modulada pelo gradiente de auxinas e citocininas, promovendo o desenvolvimento do nódulo.

- Síntese de AIA: Na planta, o promotor de crescimento, a auxina ácido indolacético (AIA), deriva do aminoácido triptofano, portanto a biossíntese desse hormônio é inibida pela ação do glifosato. A biossíntese de AIA independente do triptofano tem como precursor o indol-3-glicerol fosfato que, por sua vez, depende de corismato para sua formação. Como a síntese de corismato também é inibida pela ação do glifosato, esta via também é inibida pelo herbicida.

- Síntese de giberelina: Outro importante promotor de crescimento das plantas é a giberelina. Sabe-se que a auxina promove a biossíntese desse hormônio, portanto com a queda na produção da primeira pela ação do glifosato, a produção da giberelina também será afetada.

- Síntese de etileno: O etileno pode inibir o metabolismo de fosfolipídeos, aumentar a permeabilidade da membrana, causar perda de clorofila, aumentar a clorose, inibir a divisão e expansão celular, reduzir a síntese de DNA e aumentar a atividade da celulase nas zonas de abscisão. O aumento da atividade de celulase pode diminuir a resistência às abscisões. Para a soja, a diminuição na produção de etileno inibe a nodulação.

2.9.5 Na formação de compostos relacionados à resistência da planta

- Síntese de compostos fenólicos: Muitos compostos fenólicos agem na defesa contra herbívoros e patógenos e outros têm função no suporte mecânico. O glifosato atua tanto no metabolismo fenólico, o qual é necessário para produção de lignina e súber, quanto no metabolismo de fenilpropanóides envolvidos na resistência da planta (BRAMMALL; HIGGINS, 1988).

- Síntese de fitoalexinas: Como o glifosato é inibidor específico da conversão de chiquimato a corismato há, conseqüentemente, a redução na biossíntese de fenilalanina e, portanto, de fitoalexinas. Essas constituem um grupo de metabólitos secundários quimicamente diversos, que se acumulam em torno do local de infecção e apresentam atividade antimicrobiana. As fitoalexinas são originadas nas plantas por, pelo menos, quatro rotas metabólicas conhecidas, sendo que a do ácido chiquímico é a única que poderia ser afetada pelo glifosato. Essa rota metabólica não é a principal, pois a enzima chalcona sintetase utiliza carbonos advindos não só do ciclo do ácido chiquímico, mas também do ciclo do ácido malônico, além de outras fontes (RODRIGUES, 2005; GALLI; MONTEZUMA, 2005).

2.9.6 Na fotossíntese e na transpiração

O glifosato interfere na fotossíntese, pois o herbicida aumenta a concentração de CO_2 e fecha os estômatos, diminuindo também a transpiração. Aparentemente, o herbicida afeta as células-guardas diretamente, o que pode ser a causa do fechamento dos estômatos (SHANER, 1978). Na literatura cita-se que a transpiração só é afetada no tecido que recebe dose letal de glifosato, e este poderia indicar que o fechamento dos estômatos é um dos sintomas que antecede a morte da planta e que, a abertura e fechamento das células-guardas constituem um dos sistemas mais sensíveis à disrupção do metabolismo celular causado pelo glifosato (YAMADA; CASTRO, 2007).

Estima-se que o processo de FBN possa consumir entre 15 a 35% da produção fotossintética (SILVEIRA, 1999), portanto quando a fotossíntese é afetada pela influência do glifosato, a FBN é diretamente afetada.

2.10 DEGRADAÇÃO DO GLIFOSATO

A completa e rápida degradação do glifosato ocorre no solo e/ou na água devido à ação de microrganismos e não à ação química. Segundo Liu et al. (1991), a degradação do glifosato no solo pode seguir duas rotas. A primeira consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA). O AMPA é degradado via transaminação formando formil fosfonato, o qual se decompõe em formaldeído e fosfato inorgânico. O formaldeído pode então ser incorporado diretamente a metabólitos, decompondo-se a CO_2 que subseqüentemente pode ser fixado através da fotossíntese (COUPLAND, 1981). A segunda rota, como explicado anteriormente, consiste na transformação do glifosato em sarcosina, a qual adentra os microrganismos e degrada-se (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). A meia-vida do glifosato em solo é de aproximadamente 32 dias, enquanto que em água é de 1,5 a 11 dias.

O mecanismo de degradação do glifosato em AMPA pode ser visualizado abaixo:

$$C_3H_8NO_5P + O_2 \rightarrow AMPA$$

$$AMPA + 2\ O_2 \rightarrow PO_4^{3-} + NH_4^{+} + CO_2 + H_2O$$

Pouco é conhecido sobre a degradação do glifosato em AMPA. Nenhuma enzima da planta que faça essa conversão foi encontrada. O AMPA é ligeiramente tóxico para as plantas de soja e seu modo de ação é aparentemente diferente do glifosato. O AMPA pode fazer com que os níveis de antocianina aumentem em plântulas de soja. Tanto o glifosato quanto o AMPA sofrem adsorção no solo, tornando-se indisponíveis para as plantas. Com base no apresentado, espera-se que as variedades de soja em estudo respondam negativamente à aplicação do herbicida glifosato.

3. HIPÓTESES

A soja transgênica (soja RR) é tolerante ao uso do herbicida glifosato, princípio ativo altamente difundido no mercado mundial. Entretanto o *Bradyrhizobium japonicum,* bactéria que vive em associação simbiótica com a leguminosa, não contém o mesmo gene que confere resistência à planta. Portanto, grande proporção do rizóbio é morta devido ao efeito do produto, prejudicando a ocorrência da FBN.

4. OBJETIVOS

Comparar o efeito do glifosato em variedades de soja, transgênica e convencional, quanto à nutrição nitrogenada nos seguintes aspectos:

- produção de massa seca;

- taxas de fotossíntese e transpiração;

- interferência no acúmulo de nutrientes;

- teor SPAD;

- nodulação;

- fixação biológica de nitrogênio.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Instalação do Experimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação, localizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, no Município de Piracicaba, São Paulo.

O trabalho consistiu em plantar duas variedades de soja: uma convencional (variedade BRS Conquista) e sua isogênica transgênica (variedade BRS Valiosa - soja Roundup Ready).

As sementes, fornecidas pela Embrapa Transferência de Tecnologia/MG, foram esterilizadas e, em seguida, inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio, *Bradyrhizobium japonicum*. O inóculo, fornecido pela empresa Microquímica Indústrias Químicas Ltda., continha $2,5x10^9$ células viáveis ml^{-1}. Foi inoculado 1,5 ml da solução com o rizóbio sobre cada semente. Essas sementes foram germinadas em bandejas de plástico contendo areia autoclavada, para evitar contaminação do substrato por outra espécie de rizóbio.

Foram realizados três experimentos: para o primeiro experimento, as sementes foram germinadas em novembro/2007, para o segundo em fevereiro/2008 e para o terceiro em outubro/2008. A transferência para sistema hidropônico ocorreu, para todos os experimentos, 15 dias após a semeadura (estádio V2), quando a infecção das plântulas pelas bactérias fixadoras de nitrogênio já havia ocorrido. Foram utilizados vasos de plástico com capacidade para 2 litros com sistema de aeração da solução nutritiva. A solução utilizada foi a de Johnson et al. (1957), modificada para ¼ da necessidade de N total requerido para a cultura da soja. As plântulas foram transplantadas em solução nutritiva diluída, contendo 1/5 da dose final de nutrientes, sendo esta crescente até atingir a concentração total de nutrientes, após quatro trocas de solução.

Os experimentos consistiram na aplicação de doses crescentes do herbicida glifosato p.a., em solução nutritiva e aplicação foliar, com a finalidade de estudar seu efeito sobre plantas de soja convencional e tolerante ao mesmo produto. Os experimentos consistiram em

seis tratamentos. Na tabela 1, pode-se visualizar as doses de glifosato p.a (PM = 169) utilizadas para os experimentos.

Tabela 1 - Concentrações de glifosato p.a. utilizadas nos experimentos com soja.

TRATAMENTO	µM L^{-1}	mg L^{-1}
0	testemunha	sem glifosato
1	2	0,338
2	4	0,67
3	8	1,352
4	16	2,7
5	32	5,41

Na data do transplante, as plântulas receberam dosagens completas do princípio ativo glifosato. A partir desta data, a solução nutritiva foi trocada a cada 10 dias e as doses de glifosato foram de 50% e 25%, na segunda e terceira troca de solução, respectivamente, pois a meia-vida desse herbicida, em solução nutritiva, é de 2 a 14 dias (CARLISLE; TREVORS, 1988).

Foi aplicado Vertimec® e Derosal® em duas épocas distintas após a semeadura, aos 10 e 30 dias para o acaricida, e aos 15 e 35 dias para o fungicida, com a finalidade de controlar focos iniciais de ataque por ácaros e *Colletotrichum* sp. (antracnose), ambos identificados pelo Laboratório de Fitopatologia – Esalq/USP.

5.2 Experimento 1

As plântulas foram separadas em dois grupos: BRS Conquista, com aplicação de glifosato em solução nutritiva na data do transplante (15 dias após a semeadura) e BRS Conquista com aplicação de glifosato pulverizado nas folhas no estádio V5 (28 dias após a semeadura) e essas foram chamadas de Conquista pré e pós emergência, respectivamente. O

mesmo procedimento foi realizado para a variedade BRS Valiosa e essas plantas foram chamadas de Valiosa pré e pós emergência, respectivamente.

As folhas dos tratamentos pós-emergência foram pulverizadas com um pulverizador de mão e, em seguida, esperou-se 10 minutos para estas secarem antes de voltar as plantas ao seu local original.

A solução nutritiva foi trocada a cada 10 dias até o estádio R3 e a cada 4 dias após o florescimento pleno. Entre as trocas da solução, completou-se, diariamente, o volume dos vasos com água desionizada.

O experimento foi conduzido por 4 meses. Quando os grãos já estavam cheios, as plantas foram coletadas e as seguintes análises foram realizadas:

5.2.1 Análises biométricas:

- Contagem dos nódulos e vagens: os nódulos/vagens foram destacados de cada planta e contados;

- Peso Seco dos nódulos e vagens: os nódulos/vagens foram secos em estufa com circulação forçada de ar a 60ºC até atingirem peso constante e em seguida, pesados;

- Peso Seco da parte aérea (caule + folhas): amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 60ºC até atingirem peso constante e, em seguida, pesadas;

- Peso Seco das raízes: o mesmo procedimento realizado para a parte aérea foi utilizado para raízes. Foi realizada análise comparativa entre as variedades em estudo.

5.3 Experimento 2

Foram separadas as variedades BRS Conquista e BRS Valiosa. As plântulas germinadas em areia autoclavada, quando essas tinham 15 dias, foram transplantadas para solução nutritiva. Essa solução foi trocada a cada 10 dias e o volume foi completado, diariamente, com água desionizada.

O experimento foi coletado no estádio do florescimento pleno, R3, com 60 dias, pois é a época de maior atividade da enzima nitrogenase nos nódulos.

5.3.1 Análises biométricas:

As raízes foram cortadas, lavadas e incubadas imediatamente para análise da atividade da enzima nitrogenase pelo método de redução de acetileno. Depois da análise cromatográfica da atividade da nitrogenase, os nódulos foram destacados das raízes, contados e foi realizado o peso verde desses. As raízes foram pesadas, obtendo-se o peso verde das mesmas, em seguida, foram levadas para estufa com circulação forçada de ar, a 60ºC e, depois de atingirem peso constante, fez-se o peso seco das mesmas. O mesmo procedimento foi realizado para a parte aérea das plantas. Os nódulos foram secos à temperatura ambiente, depois de atingirem peso constante, também foram pesados.

5.3.2 Determinação da fixação biológica do N_2 pela técnica de redução de acetileno (HARDY et al., 1968; BREMNER. 1975; SAITO et al., 1980; TRIVELIN, 1983).

A técnica de redução de acetileno apresenta elevada sensibilidade e rapidez em estudos de fixação biológica e tem sido largamente empregada na avaliação da atividade da enzima nitrogenase e em estimativas da fixação de N por meio da conversão teórica de 3:1, para C_2H_2:N_2. Esse método é considerado semiquantitativo, pois se usa o fator de equivalência (fator 3) para expressar os resultados da redução de C_2H_2 em N_2.

Esse método envolve análise por cromatografia de gás de etileno produzido, quando sistemas fixadores de N_2 são expostos ao gás acetileno. O princípio da técnica consiste em incubar as raízes noduladas tão logo que essas forem cortadas e separadas da parte aérea da planta. Incuba-se cada raiz em uma magenta com capacidade para 300ml. Coloca-se 10% de gás acetileno dentro dessas magentas e espera-se o gás reagir com os nódulos por 30 minutos.

Em seguida, retira-se com ajuda de uma seringa, 15 ml do gás que se encontra dentro da magenta, o qual foi convertido, em parte, pelos nódulos, em etileno. Faz-se a leitura em cromatógrafo gasoso e obtém-se a FBN (%) em cada raiz incubada.

Em períodos curtos de incubação (30-60 minutos), as atividades de nódulos tanto separados da raiz quanto raízes noduladas intactas podem ser consideradas iguais (SAITO, 1982).

As análises de C_2H_2 e C_2H_4 foram realizadas em cromatógrafo a gás no Laboratório de Pós-Colheita, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP.

5.3.3 Determinação analítica de nutrientes

A análise de tecidos vegetais foi desenvolvida para prover informações sobre o estado nutricional das plantas, como forma de direcionar o manejo nutricional para produções ótimas (SMITH; LONERAGAN, 1997; DEON, 2007). Há muitos fatores que afetam direta ou indiretamente a concentração dos nutrientes nas plantas, que é em última análise, a resultante da atuação desses fatores (BATAGLIA et al., 1996).

O procedimento para análise da parte aérea das plantas foi secá-las, pesá-las e moê-las em moinho tipo Willey. As metodologias para determinação de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) foram descritas por Sarruge e Haag (1974).

5.4 Experimento 3

As plântulas das duas variedades foram transplantadas 15 dias após a semeadura para a solução nutritiva marcada com 4,3% de átomos em excesso de ^{15}N, utilizando como fonte de N os reagentes $K^{15}NO_3$ e $Ca(^{15}NO_3)_2.4H_2O$ A solução foi trocada a cada 10 dias e o volume foi completado diariamente com água desionizada. O experimento foi coletado no estádio de florescimento pleno, R3.

5.4.1 Procedimento de coleta:

Foram separados raiz, parte aérea (folhas), caule e nódulos. As partes das plantas foram lavadas em água desionizada e pesadas, obtendo-se assim o peso verde dessas. Os nódulos foram destacados, contados e pesados. As amostras foram colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar, a 60ºC por quatro dias, até atingirem peso constante, quando, então, foi obtido o peso seco das mesmas.

Nesse experimento realizou-se a determinação isotópica de N (% átomos de ^{15}N) em folhas e caules; estimativa do teor de clorofila através do valor SPAD; taxas de fotossíntese e transpiração medidas pelo Infra Red Gas Analyser (IRGA), além dos parâmetros biométricos: massa verde e seca da parte aérea (folhas + caule), raiz e nódulos e número de nódulos.

5.4.2 Determinação isotópica de N:

As determinações do teor de N (%) nas amostras com abundância isotópica natural e determinação isotópica nas amostras de soja enriquecidas foram realizadas por espectrometria de massas (espectrômetro de massas modelo ANCA-SL 20-20 da Europa Scientific, utilizado para amostras líquidas e sólidas). O equipamento está instalado no Laboratório de Isótopos Estáveis – CENA/USP.

A contribuição da FBN foi quantificada para a cultura da soja pela técnica de diluição isotópica de ^{15}N, baseada na abundância natural desse isótopo. Essa técnica é considerada a maneira mais promissora de quantificar as contribuições da fixação de N_2 atmosférico pelas plantas (COÊLHO, 2006).

A metodologia para a determinação isotópica de N foi descrita por Bendassolli (2002)*. Amostras orgânicas com aproximadamente 100 μg de N, finamente moídas, são seladas em cápsulas miniaturas de estanho (Sn), sendo admitidas em um ANCA. As amostras são purgadas do ar com um fluxo de He ultrapuro no auto-amostrador. A temperatura no local causa completa combustão da amostra. O gás entra na fonte e o N-total e a razão $^{15}N^{14}N$ são analisados, por meio das intensidades das massas 28 ($^{14}N^{14}N$), 29 ($^{15}N^{14}N$) e 30 ($^{15}N^{15}N$). As amostras sólidas, a serem analisadas no ANCA, são finamente moídas para assegurar a homogeneidade tanto na análise de N-total assim como na de ^{15}N. São fornecidos dados do teor de N-total (%) e a abundância isotópica (% em átomos de ^{15}N). Em seguida, a contribuição da FBN (%) foi calculada pela diferença do NPPS (%) e a Abundância de ^{15}N (%) em cada amostra, como mostra as equações abaixo:

$$\% \text{ NPPS} = [(a-b) / (c-b)] \,.\, 100$$

% NPPS: % de N na planta proveniente da Solução Nutritiva

a: % de ^{15}N na planta (% átomos de ^{15}N)

b: % de ^{15}N controle (0,366) – variação natural de ^{15}N na atmosfera

c: % de ^{15}N na Solução Nutritiva enriquecida

$$\% \text{ FBN} = 100 - \% \text{ NPPS}$$

% FBN = % de N proveniente da Fixação Biológica de Nitrogênio

% NPPS = % de N proveniente da Solução Nutritiva

* informação pessoal

5.4.3 Estimativa do teor de clorofila através do índice SPAD

Foi utilizado o Chlorophyll Meter SPAD-502, (Soil Plant Analysis Development Section, Minolta Camera co., Osaka, Japan) para determinação indireta da concentração de clorofila em valor SPAD em folhas intactas. Através do medidor de clorofila obtém-se a avaliação do teor de N na folha.

As leituras com clorofilômetro foram realizadas em dois estádios de desenvolvimento da planta: com 22 dias, em V3 e com 35 dias, em V6. Foram realizadas quatro leituras por trifólio e computou-se uma média das leituras executadas.

5.4.4 INFRA RED GAS ANALYSER (IRGA)

A troca gasosa entre a folha e a atmosfera é a maior troca de massa da planta com o ambiente. Na folha também é realizada a absorção de energia (irradiância solar fotossinteticamente ativa) e transformação energética, energia luminosa em química (fotoquímica da fotossíntese). A troca de gases envolve processos biofísicos (abertura estomática), bioquímicos (seqüestro do CO_2) e fotoquímicos (absorção de irradiância, fluorescência da clorofila e quebra de moléculas de água em $4H^+ + O_2$). Estes processos são sensíveis aos estresses ambientais, sendo possível detectar alterações em minutos (PRADO; CASALI, 2006).

De acordo com Silva (2007), o princípio básico de funcionamento deste aparelho está relacionado à capacidade do CO_2 e H_2O em absorver o infravermelho. A medida da taxa de assimilação de CO_2 neste sistema é baseada nas diferenças de concentração de CO_2 entre o ar que entra e o ar que deixa a câmara fotossintética. A transpiração também pode ser medida da mesma forma. Os controles das concentrações de H_2O e CO_2 são realizados através de sistemas eletromecânicos e podem direcionar o fluxo de ar inicial (contendo CO_2 e H_2O) em

tubos contendo soda calcária (para retenção do CO_2) e/ou drierite (para retenção de H_2O), antes de passar pela câmara fotossintética.

As avaliações dos parâmetros fisiológicos, taxa de assimilação de gás carbônico e de transpiração das plantas foram realizadas com analisador de gás por infravermelho portátil (Infra Red Gas Analyzer - IRGA), modelo Li6400 (Li-COR Biosciences, 2005) em plantas com 60 dias, sendo avaliada uma folha por planta. Para a avaliação da fotossíntese e da transpiração, a folha permanecia na câmara de análise por dois minutos, até a estabilização da leitura.

5.5 Delineamento Experimental

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). O primeiro experimento foi realizado em esquema fatorial 6 X 2 X 2, sendo: 6 tratamentos (testemunha, sem aplicação do herbicida e outros cinco que receberam doses crescentes de glifosato); 2 variedades de soja (convencional – BRS Conquista e sua isogênica RR – BRS Valiosa), 2 épocas distintas de aplicação do herbicida (aplicação em solução nutritiva em V2 e aplicação foliar em V5), com três repetições.

O segundo e o terceiro experimentos foram realizados em esquema fatorial 6 X 2: 6 tratamentos (testemunha e mais cinco que receberam doses crescentes do herbicida glifosato em solução); 2 variedades de soja (Conquista e Valiosa), com cinco repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade, realizado no programa ASSISTAT.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito do glifosato na produção de matéria seca e no número de vagens

Os resultados encontrados para produção de Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) para a Valiosa (Gráfico 1) também foram registrados para produção de Massa Seca da Raiz (MSR) (Gráfico 2) para a mesma variedade, ou seja, não houve variação expressiva de biomassa. Para a Conquista houve decréscimo acentuado desta produção, tanto para MSPA (Gráfico 1) quanto para MSR (Gráfico 2).

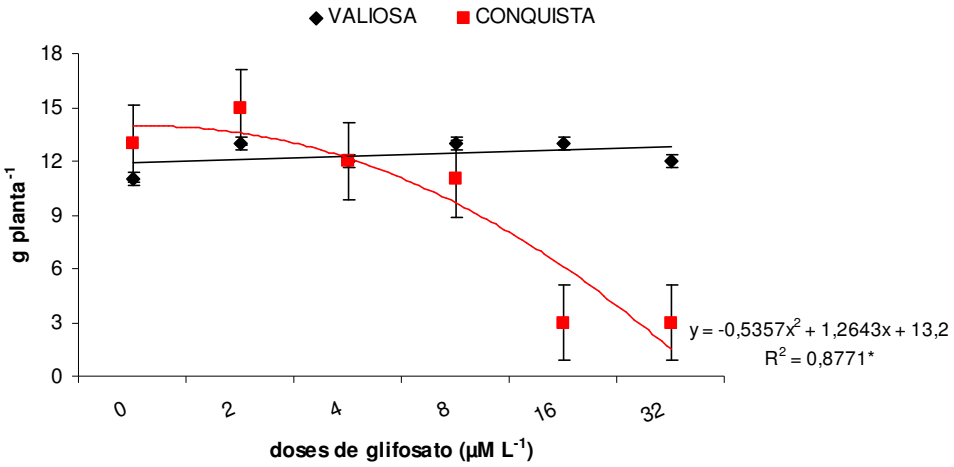

Gráfico 1. Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) no Experimento 2, variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução. *Significativo a 5% de probabilidade.

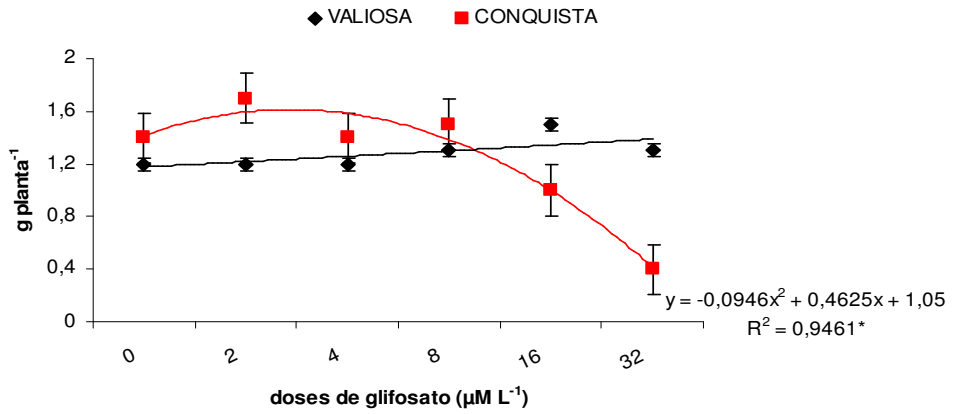

Gráfico 2. Massa Seca da Raiz (MSR) no Experimento 2, variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução. *Significativo a 5% de probabilidade.

Para a variedade Conquista foi observado decréscimo de 71% da biomassa total na raiz entre os tratamentos testemunha e 5 (32 μM L^{-1}). Esses dados concordam com os obtidos por Tillmann (2004), o qual observou que na presença de glifosato, sementes não-transgênicas normalmente apresentam crescimento lento até o completo cessamento deste. Uma hipótese para as reduções ocorridas no acúmulo de MSPA e MSR é o processo de degradação do glifosato dentro da planta, que resulta na formação do ácido aminometilfosfônico (AMPA), uma fitotoxina (DUKE et al., 2003; REDDY et al., 2004; OLIVEIRA, 2008). Entretanto, essa transformação em AMPA dentro da planta depende da taxa de glifosato aplicada, do genótipo e das condições ambientais. Outra possível explicação para a redução da produção de massa seca causada pelo aumento das doses de glifosato, segundo Bartels (1985), pode ser o processo de mitose e ruptura dos plastídios, como efeito indireto e secundário desse herbicida. Essas suposições são confirmadas com os experimentos de King et al. (2001), que testaram o efeito do glifosato sobre plantas totalmente dependentes da nodulação para obtenção de nitrogênio e plantas supridas com nitrogênio mineral. Esses autores observaram decréscimo na biomassa da parte aérea das plantas supridas ou não com nitrogênio. Esse fato sugere um possível efeito direto negativo do glifosato sobre a produção de massa seca da parte aérea, sem que a redução na nodulação seja a principal responsável por esse decréscimo.

No presente experimento foi possível visualizar os efeitos negativos do glifosato em soja convencional. As fotos da Figura 6 mostram as raízes da variedade Conquista, comparando a testemunha e o tratamento 5, o qual recebeu a dose mais elevada do herbicida no experimento 1. Para a variedade Valiosa, essa redução de biomassa não foi perceptível visualmente.

Figura 6. Comparação das raízes de soja, variedade Conquista, aos 120 dias, entre a testemunha e o tratamento 5 (32 µM L^{-1} de glifosato em solução nutritiva).

Em relação aos experimentos realizados com soja transgênica, Duke (2003) constatou que essas não são totalmente resistentes, pois, em certas condições, elas apresentam inibição de crescimento com aplicação acima de 2,24 kg de glifosato ha^{-1}. Reddy et al. (2001) também encontraram redução da massa seca tanto da parte aérea quanto do sistema radicular de plantas de soja transgênicas tratadas com glifosato em comparação com a testemunha sem herbicida; no entanto, esses resultados só foram possíveis com doses acima de 2,24 kg de glifosato ha^{-1}. Para o presente experimento, a variedade Valiosa não sofreu danos devido à ação do herbicida.

O acúmulo de biomassa na Valiosa não foi reduzido pelos tratamentos com o herbicida, pois a soja transgênica apresenta uma enzima insensível ao glifosato, a enzima EPSP sintase.

Chakravarty e Chatarpaul (1990) sugeriram que a inibição do crescimento de raízes é o primeiro efeito dos herbicidas, pois o glifosato aplicado nas folhas é rapidamente absorvido e translocado, acumulando em tecidos de raiz, sendo, portanto, esta, o primeiro alvo e o mais afetado pela ação do produto. Sintomas na soja convencional, como redução no desenvolvimento das radículas, foram observados nos presentes experimentos e observou-se também a formação de inúmeras, no entanto, finas raízes laterais. França-Neto et al. (1998), que também trabalharam com a variedade Conquista, constataram drástica redução do desenvolvimento das radículas, principalmente secundárias. Já Brammall (1988) observou necrose na raiz primária e depois de 7 a 14 dias após o tratamento com glifosato, verificou-se o crescimento do hipocótilo e o desenvolvimento de finas e numerosas raízes laterais. Danos maiores talvez pudessem ter sido evidenciados nos experimentos realizados, pois as sementes foram germinadas em areia sem aplicação de glifosato e só depois da ocorrência do processo de nodulação as plântulas foram transferidas para solução nutritiva contendo o herbicida (15 dias após a semeadura). Segundo as observações de Whigham e Stoller (1979), muitas sementes germinadas reduzem seu vigor com a aplicação de glifosato. Esse produto é translocado para o meristema apical de sementes desenvolvidas depois da aplicação do herbicida, mas o mesmo não ocorre com aquelas já desenvolvidas antes da aplicação.

Nos três experimentos realizados foram encontradas anormalidades morfológicas na variedade convencional, tanto em raízes quanto na parte aérea das plantas de soja, em doses mais elevadas de glifosato em solução nutritiva (tratamentos 4 e 5). Na Figura 7 é possível visualizar as raízes de soja do tratamento 5 (32 $\mu M\ L^{-1}$) tanto da variedade convencional quanto da transgênica. Observa-se redução no tamanho da raiz da Conquista quando

comparada com o mesmo tratamento da Valiosa. Na Figura 8 é possível visualizar a parte aérea das plantas de soja do tratamento 5 (32 µM L^{-1}) de ambas as variedades. Observaram-se anormalidades nos trifólios da Conquista. A Valiosa não apresentou danos após serem tratadas com o herbicida glifosato. Shaner (1978) observou que as plantas apresentam várias respostas à aplicação do glifosato, além de clorose elas podem apresentar anormalidades morfológicas, como as visualizadas nos experimentos realizados.

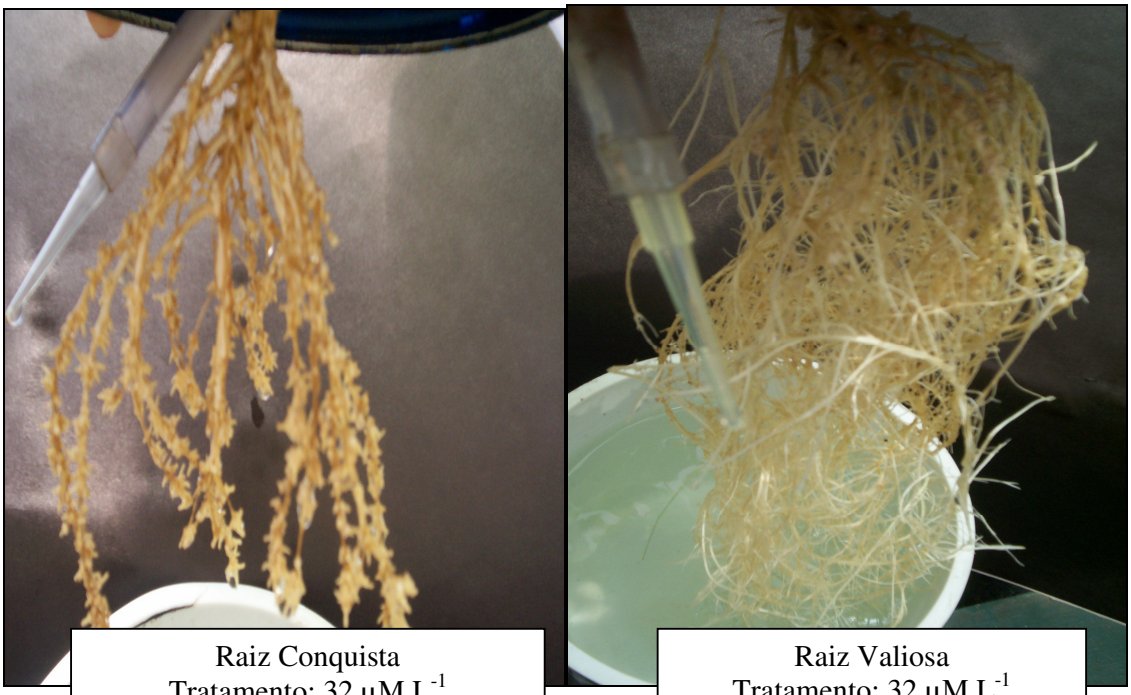

Figura 7. Comparação entre as raízes de soja, variedade Conquista e Valiosa, aos 60 dias, sob aplicação de 32 µM L^{-1} de glifosato em solução nutritiva.

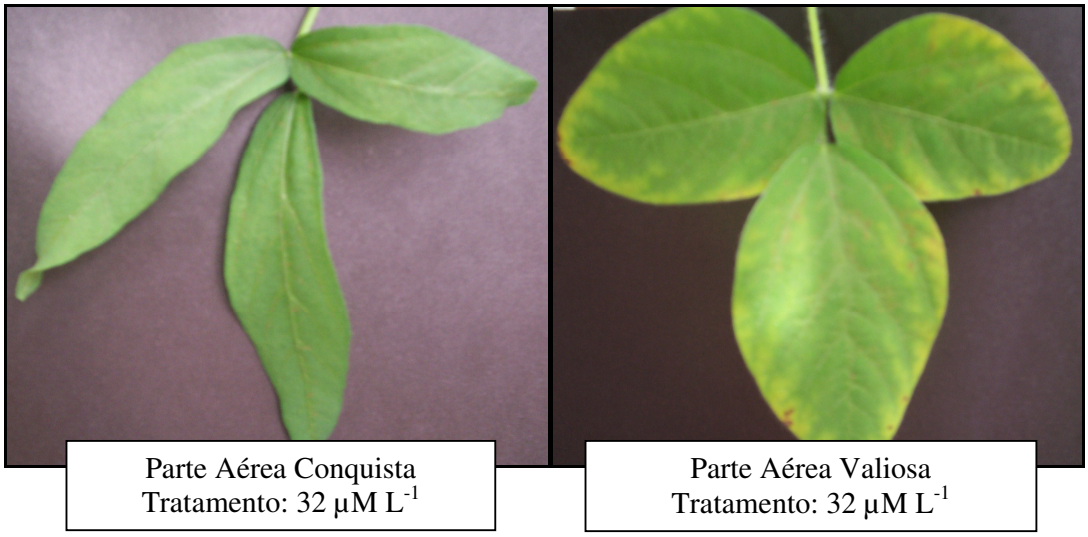

Figura 8. Comparação entre os trifólios de soja, variedades Conquista e Valiosa, aos 60 dias, sob aplicação de 32 µM L^{-1} de glifosato em solução nutritiva.

Os resultados obtidos no Experimento 1 mostraram que a época de aplicação do herbicida não afeta a fisiologia da planta. Para as aplicações de glifosato em solução nutritiva, obteve-se dados semelhantes para todos os experimentos, sendo a Conquista mais afetada negativamente que a Valiosa. Observou-se que a soja de ambas as variedades não responderam a aplicações foliares do produto, por esse motivo descartou-se essas aplicações para os experimentos subseqüentes. Já Holländer e Amrhein (1980) observaram que o glifosato foi fortemente inibitório quando aplicado em raiz de plântulas intactas, mas também teve alguma ação, mesmo que menores, quando essas foram pulverizadas.

Os gráficos abaixo referem-se a produção de MSPA (Gráfico 3) e de MSR (Gráfico 4) nas variedades de soja estudadas, em épocas distintas da aplicação do glifosato.

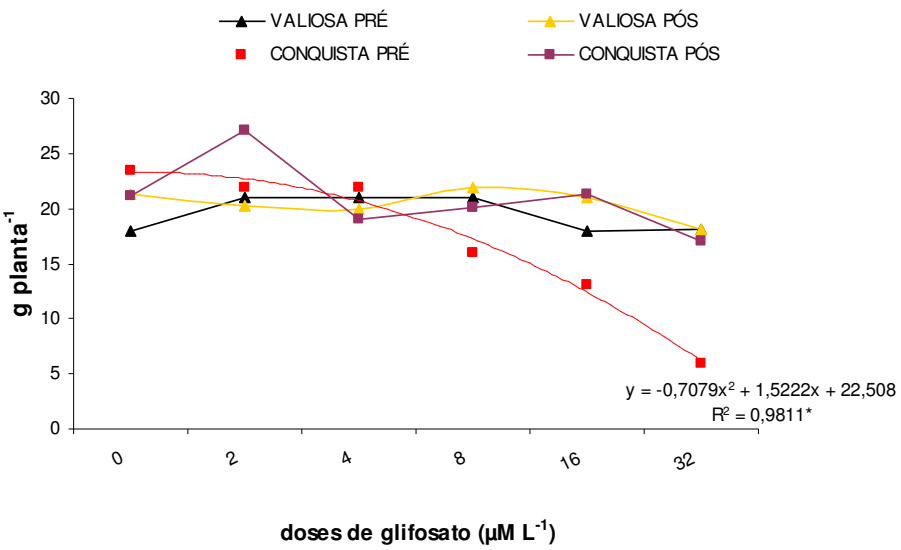

Gráfico 3. Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) no Experimento 1, nas variedades Conquista e Valiosa, em duas formas distintas de aplicação do herbicida glifosato. *Significativo a 5% de probabilidade. Pré: glifosato aplicado no estádio V2, na solução nutritiva; Pós: glifosato aplicado no estádio V5, por pulverização foliar

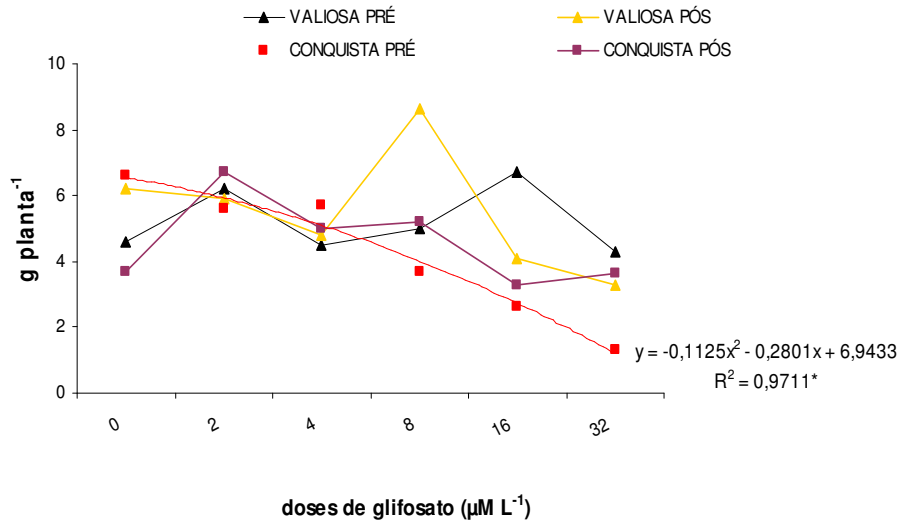

Gráfico 4. Massa Seca da Raiz (MSR) no Experimento 1, nas variedades Conquista e Valiosa, em duas formas distintas de aplicação do herbicida glifosato. *Significativo a 5% de probabilidade. Pré: glifosato aplicado no estádio V2, na solução nutritiva; Pós: glifosato aplicado no estádio V5, por pulverização foliar

Foi analisado, no Experimento 1, a influência do glifosato na produtividade da soja. Observou-se que apenas a Conquista pré foi afetada, apresentando uma redução de 72% no número de vagens (NV) entre a testemunha e o tratamento 5, enquanto que, nos demais tratamentos testados – Valiosa pré e pós emergência e Conquista pós emergência, não foi verificado diferenças em NV (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de vagens no Experimento 1, nas variedades Conquista e Valiosa, em duas épocas distintas de aplicação do herbicida glifosato.

	NÚMERO DE VAGENS						
DOSES DE GLIFOSATO	**0**	**2µm L^{-1}**	**4µm L^{-1}**	**8µm L^{-1}**	**16µm L^{-1}**	**32µm L^{-1}**	**CV (%)**
VALIOSA PRÉ[1]	70 a	63 a	60 a	64 a	60 a	66 a	10
VALIOSA PÓS[2]	64 a	62 a	66 a	61 a	70 a	73 a	12
CONQUISTA PRÉ[1]	66 a	59 a	60 a	51 ab	42 b	15 c	11
CONQUISTA PÓS[2]	59 a	49 a	56 a	65 a	52 a	55 a	13

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. [1] Pré: glifosato aplicado no estádio V2, na solução nutritiva; [2] Pós: glifosato aplicado no estádio V5, por pulverização foliar

6.2 Efeito do glifosato nas taxas de fotossíntese e transpiração

Observa-se nas Tabelas 3 e 4 os resultados das taxas de fotossíntese e de transpiração obtidas pelo IRGA para as variedades Valiosa e Conquista. Verifica-se que não houve efeito das concentrações de glifosato na solução nutritiva nestes parâmetros fisiológicos para as duas variedades. Vários trabalhos relatados em literatura mostraram que a taxa de fotossíntese é diminuída devido aos efeitos do herbicida, como evidenciados por Costa (2003), Ketring et al. (1982) e Lévesque (1987).

Tabela 3 - Taxa de Fotossíntese medida nas folhas de soja, variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução.

FOTOSSÍNTESE (µmol CO_2 m^{-2} s^{-1})							
DOSES DE GLIFOSATO	**0**	**2µm L^{-1}**	**4µm L^{-1}**	**8µm L^{-1}**	**16µm L^{-1}**	**32µm L^{-1}**	**CV (%)**
VALIOSA	9,6 a	10,4 a	9,4 a	7,4 a	11,9 a	10,8 a	32
CONQUISTA	8,1 a	8,3 a	7,5 a	7,8 a	5,7 a	8,6 a	26

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4 - Taxa de Transpiração medida nas folhas de soja, variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução.

TRANSPIRAÇÃO (mmol H_2O m^{-2} s^{-1})							
DOSES DE GLIFOSATO	**0**	**2µm L^{-1}**	**4µm L^{-1}**	**8µm L^{-1}**	**16µm L^{-1}**	**32µm L^{-1}**	**CV (%)**
VALIOSA	5,5 a	6,3 a	4,4 a	3,8 a	5,1 a	5,2 a	34
CONQUISTA	4,8 a	4,1 a	6,1 a	4,1 a	3,8 a	4,9 a	28

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar que os valores de fotossíntese e de transpiração são maiores para a variedade transgênica, sendo de 15-20% para a fotossíntese (Tabela 3) e de 13% para a transpiração. Essas diferenças poderiam ser devidas às condições climáticas dominantes no momento da determinação, ou seja, as determinações na variedade Conquista e Valiosa foram realizadas com um dia de diferença. Costa (2003) em seus estudos com soja cultivada em atmosfera enriquecida com CO_2, obteve resultados semelhantes aos encontrados neste experimento para dados de transpiração. O autor encontrou o valor de 5,2 mmol m^{-2} s^{-1}, enquanto que as médias dos resultados obtidos neste experimento foram de 4,7 - 5,0 mmol m^2s^{-1} para a variedade Conquista e Valiosa, respectivamente. No entanto, as taxas de fotossíntese medidas nesse experimento foram menores que as obtidas por Costa (2003). O autor obteve resultados de 21 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}, enquanto que as médias dos resultados

obtidos nesse experimento foram de 7,6 e 9,9 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} para Conquista e Valiosa, respectivamente. A diferença entre as taxas de fotossíntese determinadas, comparadas às de Costa (2003), pode ser provavelmente devido às variedades de soja utilizadas serem diferentes nos dois estudos, sendo a Conquista e a Valiosa para o presente experimento e as linhagens L147 e L150 para o experimento de Costa (2003). Para Ketring et al. (1982)*, citados por Erismann (2006), os valores de fotossíntese encontrados em folhas de amendoim estão dentro do intervalo de 13 a 41 µmol m^{-2} s^{-1}. Lévesque (1987) constatou que, em aproximadamente três dias depois do tratamento com o herbicida, a respiração e a fotossíntese começaram a ser gradualmente inibidas, além da ocorrência de clorose nas folhas. Richard-Jr e Slife (1979) observaram que a transpiração foi reduzida depois de 2 horas da aplicação do glifosato. Segundo esses autores, a transpiração não foi completamente inibida, permitindo que a absorção de água continuasse ao longo do tempo. O mesmo efeito foi encontrado para esse experimento, a fotossíntese e a transpiração não foram inibidas a ponto de causar senescência nas folhas e esses processos continuaram ao longo do ciclo da soja, no entanto a clorose foi evidente para todos os tratamentos.

6.3 Efeito do glifosato no acúmulo de nutrientes

Observa-se na Tabela 5 os resultados dos pesos dos nutrientes acumulados até a fase R3. Esses resultados comprovam que não houve diferença no acúmulo de macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S) na soja transgênica com a aplicação de glifosato. No entanto, para a variedade Conquista houve drástica redução no acúmulo dos macronutrientes, sendo 64% para P, 80% para K, 69% para Ca, 74% Mg e 65 % para S, entre a testemunha e o tratamento 5.

---

* KETRING, D.L.; BROWN, R.H.; SULLIVAN, G.A.; JOHNSON, B.B. Growth physiology. In: PATTEE, H.E.; YOUNG, C.T. (Ed.). **Peanut science and technology**. Yoakum: American Peanut Research and Education Society, p.411-457, 1982.

O glifosato interferiu no acúmulo desses elementos na variedade Conquista, pois a inibição do ácido chiquímico causada pela aplicação desse herbicida, pode interferir em processos fisiológicos do sistema radicular.

O efeito negativo do glifosato pode ser explicado pela redução na biomassa da parte aérea da variedade Conquista. Cakmak (2007) observou que o glifosato, principalmente na concentração de 0,9% da dose recomendada para aplicação no campo, aplicado três vezes antes do florescimento na parte aérea de plantas de soja convencional, causou redução nos teores de Ca nos grãos, redução nos teores foliares de Mg e Ca e também redução no peso seco dos grãos, da palha e da planta inteira. Santos (2007) também observou diminuição no acúmulo de alguns nutrientes (N, Ca, Fe e Cu) quando plantas de soja foram tratadas com glifosato e analisadas na fase de florescimento da cultura.

Como a soja transgênica é tolerante ao herbicida glifosato, a expressão das enzimas mantém os níveis normais dos aminoácidos aromáticos, prevenindo distúrbios metabólicos causados pela inibição da via do chiquimato. No entanto, até o momento, ainda são escassos os trabalhos que se referem ao acúmulo de macronutrientes em plantas tolerantes ao herbicida, mas vários estudos têm sido realizados para analisar acúmulo de micronutrientes em variedades de soja quando essas recebem aplicação do herbicida glifosato.

No caso da variedade Valiosa, o acúmulo dos macronutrientes e do B, do Fe, do Mn não sofreu interferência da aplicação do glifosato. Entretanto, o acúmulo de Cu e Zn foi influenciado significativamente pela aplicação desse produto. As quantidades acumuladas de Cu e Zn nos tratamentos que receberam 32µM L^{-1} de glifosato foram 57% e 75% menores, respectivamente, para o Cu e Zn em relação a testemunha. Para a Conquista, houve drástica redução no acúmulo dos micronutrientes, sendo 73% para B, 79% para Cu, 63% para Fe, 57% para Mn e 71% para Zn, entre a testemunha e o tratamento 5 (Tabela 5).

Tabela 5 - Acúmulo de nutrientes em soja, nas variedades Valiosa e Conquista.

ACÚMULO DE NUTRIENTES NA PARTE AÉREA DE SOJA							
DOSES DE GLIFOSATO	**0**	**2 µM L^{-1}**	**4 µM L^{-1}**	**8 µM L^{-1}**	**16 µM L^{-1}**	**32 µM L^{-1}**	**CV (%)**
FÓSFORO (mg $planta^{-1}$)							
VALIOSA	90 a	100 a	90 a	100 a	110 a	100 a	11
CONQUISTA	110 b	130 a	100 b	80 c	50 d	40 d	9
POTÁSSIO (mg $planta^{-1}$)							
VALIOSA	270 a	250 a	210 a	260 a	250 a	210 a	12
CONQUISTA	300 a	310 a	250 b	240 b	80 c	60 c	9
CÁLCIO (mg $planta^{-1}$)							
VALIOSA	120 a	140 a	130 a	120 a	130 a	130 a	15
CONQUISTA	130 ab	140 a	140 ab	120 b	50 c	40 c	11
MAGNÉSIO (mg $planta^{-1}$)							
VALIOSA	29 a	34 a	32 a	31 a	28 a	28 a	11
CONQUISTA	39 a	40 a	33 a	34 a	13 b	10 b	14
ENXOFRE (mg $planta^{-1}$)							
VALIOSA	17 a	20 a	17 a	18 a	19 a	16 a	13
CONQUISTA	17 b	25 a	19 b	17 b	7,5 c	5,9 c	9
BORO (µg $planta^{-1}$)							
VALIOSA	600 a	620 a	510 a	670 a	600 a	530 a	18
CONQUISTA	670 a	630 a	600 ab	490 b	200 c	180 c	13
COBRE (µg $planta^{-1}$)							
VALIOSA	21 ab	20 ab	25 ab	34 a	24 ab	12 b	31
CONQUISTA	24 b	18 bc	37 a	29 ab	8 cd	5 d	29
FERRO (µg $planta^{-1}$)							
VALIOSA	1550 a	2090 a	1700 a	1670 a	1720 a	1460 a	20
CONQUISTA	1970 b	2490 ab	2850 a	2330 ab	810 c	730 c	22
MANGANÊS (µg $planta^{-1}$)							
VALIOSA	950 a	1210 a	1040 a	1300 a	1020 a	930 a	19
CONQUISTA	1190 a	1340 a	1310 a	1160 a	630 b	510 b	18
ZINCO (µg $planta^{-1}$)							
VALIOSA	240 ab	320 a	270 ab	320 a	260 ab	180 b	25
CONQUISTA	210 b	260 ab	300 a	330 a	80 c	60 c	18

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Estudos realizados por Cakmak (2007) constataram que o glifosato aplicado nas folhas de girassol, com concentração de 6% da dose recomendada desse herbicida para soja, simulando efeitos de deriva, diminuiu a absorção e translocação de Fe, Mn e Zn. Huber (2007) obteve resultados que corroboram com os encontrados nesse trabalho e com os estudos de Cakmak (2007), constatando que há indícios de deficiência de Zn em soja transgênica tratada com glifosato, pois a cultura respondeu bem a aplicações de Zn foliar 15 dias após a aplicação do herbicida.

Muitos trabalhos encontrados na literatura citam a ocorrência de deficiências de Mn e Fe motivados pela ação do glifosato. Gordon (2007) observou que ocorreu deficiência de Mn em soja transgênica e constatou ainda que o glifosato interferiu na absorção desse elemento e causou a morte de microrganismos do solo redutores de Mn. Yamada e Castro (2007) afirmaram que o glifosato inibe a aquisição de Mn, Fe e Zn, mesmo quando o produto é aplicado em taxas consideradas extremamente baixas na faixa de concentração da deriva do herbicida (1%-10% das doses recomendadas para a cultura da soja). No entanto, neste experimento não foi constatado deficiências desses micronutrientes para a variedade Valiosa.

6.4 Efeito do glifosato no acúmulo e no teor de Nitrogênio

Não houve redução no acúmulo de nitrogênio na parte aérea para a Valiosa com as doses de glifosato utilizadas no presente experimento, no entanto, para a Conquista houve redução de 71% no acúmulo desse nutriente entre a testemunha e o tratamento 5 (Tabela 6). Souza (1999) constatou em seus estudos que, aos 45 dias, não foram observadas interações nos parâmetros de desenvolvimento da planta (acúmulo de N na parte aérea), porém aos 65 dias, fortes interações foram observadas nesses parâmetros, mas como o presente experimento foi coletado no estádio R3, aos 60 dias, não se pode inferir se haveria ou não os mesmos efeitos encontrados pelo citado autor.

Tabela 6 - Acúmulo de nitrogênio em soja, Experimento 2, nas variedades Valiosa e Conquista.

ACÚMULO DE NITROGÊNIO NA PARTE AÉREA DE SOJA							
DOSES DE GLIFOSATO	**0**	**2 µM L^{-1}**	**4 µM L^{-1}**	**8 µM L^{-1}**	**16 µM L^{-1}**	**32 µM L^{-1}**	**CV (%)**
			NITROGÊNIO (mg $planta^{-1}$)				
VALIOSA	380 a	370 a	320 a	380 a	350 a	320 a	13
CONQUISTA	410 a	300 b	270 bc	230 c	80 d	120 d	14

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Segundo Bataglia et al. (1976), o teor de N na parte aérea (folhas) da planta de soja analisada aos 50 dias é de 40g kg^{-1} e para o caule é de 16 g kg^{-1}. Entretanto, visualiza-se na Tabela 7 que, para ambas as variedades, estes valores estão abaixo do referido pelo autor.

Na Valiosa, o teor de N no tratamento testemunha que era de 34 g kg^{-1} na parte aérea, sofre decréscimo de 20-25% com a aplicação do glifosato, sendo de 27 g kg^{-1} o teor médio desse elemento encontrado nos tratamentos com o herbicida. O N acumulado na soja é proveniente da FBN, do solo, do fertilizante e em algumas condições é absorvido do ar na forma de amônia. Na soja Valiosa, obtida no Brasil, a maior parte do N acumulado é proveniente da FBN.

Apesar da redução de 20-25% no teor de N na parte aérea da Valiosa, não significa que possa estar havendo efeito na FBN, pois caso isso estivesse acontecendo, a soja poderia compensar o N exigido, absorvendo mais N do solo.

Na variedade Conquista o teor de N nas folhas foi em média 50% menor que o indicado por Bataglia et al. (1976). Um aspecto relevante é que houve inicialmente redução do teor de N nas folhas para as quatro primeiras doses de glifosato e para a dose maior houve incremento significativo desse elemento, mas este fato se deve à redução de crescimento dessas plantas, mostrado no Gráfico 1. As mesmas observações podem ser aplicadas aos teores de N no caule das duas variedades.

Tabela 7 - Teor de Nitrogênio total (%), na parte aérea (folhas) e no caule de plantas de soja, variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução.

DOSES DE GLIFOSATO	0	2 µM L^{-1}	4 µM L^{-1}	8 µM L^{-1}	16 µM L^{-1}	32 µM L^{-1}	CV (%)
TEOR DE NITROGÊNIO EM SOJA – PARTE AÉREA (g kg^{-1})							
VALIOSA	34 a	28 b	29 b	27 b	27 b	26 b	7
CONQUISTA	29 b	19 c	21 c	20 c	20 c	41 a	9
TEOR DE NITROGÊNIO EM SOJA - CAULE (g kg^{-1})							
VALIOSA	9 a	9 a	9 a	8 a	9 a	9 a	7
CONQUISTA	7 b	7 b	8 b	9 b	9 b	11 a	12

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

6.5 Efeito do glifosato no índice SPAD

As leituras do clorofilômetro expressam indiretamente a quantidade de clorofila no tecido vegetal e como o nitrogênio é componente da molécula de clorofila, a concentração deste nutriente no tecido correlaciona-se positivamente com os valores SPAD, como já comprovado em diversos estudos (LAVRES JÚNIOR, 2001).

Os resultados das tabelas 8 e 9 mostram que os valores SPAD nas duas variedades de soja estão abaixo dos valores encontrados em literatura, para as duas épocas estudadas, V3 e V6. Torres-Netto et al. (2002) encontraram em seus experimentos, com várias culturas, que os valores SPAD variaram entre 45 e 55. Estes valores revelam ótima disponibilidade de N no tecido foliar, bem como excelente quantidade de pigmentos fotossintéticos.

Os valores encontrados no presente trabalho estão entre 20 e 30 unidades SPAD para ambas as variedades, nas duas épocas estudadas.

Tabela 8 – Valor SPAD obtido no estádio V3. Experimento 3.

DOSES DE GLIFOSATO	0	2µm L^{-1}	4µm L^{-1}	8µm L^{-1}	16µm L^{-1}	32µm L^{-1}	CV (%)
1º TRIFÓLIO – VALOR SPAD							
VALIOSA	28 a	26 a	25 a	27 a	26 a	30 a	4
CONQUISTA	30 a	30 a	29 a	30 a	26 b	20 c	5
2º TRIFÓLIO – VALOR SPAD							
VALIOSA	28 a	23 b	25 ab	24 ab	23 b	25 ab	5
CONQUISTA	25 ab	23 abc	25 ab	25 a	22 bc	21 c	6

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 9 - Valor SPAD obtido no estádio V6. Experimento 3.

DOSES DE GLIFOSATO	0	2µm L^{-1}	4µm L^{-1}	8µm L^{-1}	16µm L^{-1}	32µm L^{-1}	CV (%)
1º TRIFÓLIO – VALOR SPAD							
VALIOSA	30 a	29 a	30 a	29 a	29 a	30 a	3
CONQUISTA	30 a	29 a	30 a	29 ab	27 b	23 c	4
2º TRIFÓLIO – VALOR SPAD							
VALIOSA	30 a	28 a	29 a	28 a	27 a	29 a	3
CONQUISTA	29 a	29 a	29 a	28 a	27 a	27 a	6
3º TRIFÓLIO – VALOR SPAD							
VALIOSA	29 a	25 a	26 a	27 a	25 a	28 a	6
CONQUISTA	28 a	28 a	29 a	29 a	30 a	23 b	5
4º TRIFÓLIO – VALOR SPAD							
VALIOSA	26 a	22 bc	21 c	24 ab	22 bc	24 ab	3
CONQUISTA	23 b	23 b	24 a	24 a	24 a	21 c	4

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Kitchen et al. (1981) afirmaram que o glifosato inibe a síntese do δ-aminolevulinato, precursor da clorofila e Siqueira et al. (1999) observaram que explantes de soja tolerantes ao glifosato quando tratados com o herbicida apresentaram baixa concentração de clorofila total. Os dados obtidos por Reddy e Zablotowicz (2003) também demonstraram que a aplicação de glifosato em soja transgênica causa injúrias, incluindo decréscimo nos conteúdos de clorofila. As folhas mais jovens de ambas as variedades apresentaram menores valores de SPAD, como

é o caso do 2º trifólio para a variedade Valiosa na primeira leitura (Tabela 8) e do 4º trifólio para a mesma variedade na segunda leitura (Tabela 9). Para a variedade Conquista, o efeito do glifosato foi mais evidente em todas as leituras, pois obtiveram-se menores valores nos tratamentos com doses mais elevadas de glifosato aplicado na solução nutritiva. Yamada e Castro (2007) afirmam que, tanto em laboratório como em condições de campo, a clorose é o sintoma comum e precoce da injúria do glifosato às plantas. Os autores afirmam ainda que a clorose pode desenvolver-se em folhas novas, possivelmente devido à falta de clorofila. Os dados encontrados por esses autores corroboram com os resultados do presente experimento, uma vez que a clorose foi mais evidente nos trifólios mais novos. Gazziero et al. (2006) também encontraram em seus estudos que a clorose causada por glifosato é vista principalmente na fase inicial do desenvolvimento da planta.

6.6 Efeito do glifosato sobre nodulação

Os resultados de número e massa seca de nódulos obtidos nos experimentos 2, 3 e 1 encontram-se, respectivamente, nas tabelas 10, 11 e 12.

Para a variedade Conquista constatou-se que houve diminuição significativa no número e massa seca de nódulos, nos três experimentos, à medida que aumentou-se a concentração de glifosato aplicado na solução nutritiva (experimentos 1, 2 e 3) e pulverizados nas folhas no estádio V5 (experimento 1).

Para a variedade tolerante, Valiosa, não foi verificado efeito do herbicida em diminuir o número e a massa de nódulos com o aumento da concentração do produto em solução nutritiva (experimentos 2 e 3). Entretanto, quando o herbicida foi aplicado na solução nutritiva ou nas folhas de soja no estádio V5 (experimento 1), o efeito deletério foi constatado quando a concentração de glifosato foi de $32 \mu M\ L^{-1}$ comparado ao tratamento testemunha.

Tabela 10 - Número e massa seca dos nódulos no Experimento 2, nas variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução.

DOSES DE GLIFOSATO	0	2µm L^{-1}	4µm L^{-1}	8µm L^{-1}	16µm L^{-1}	32µm L^{-1}	CV (%)
			NÚMERO DE NÓDULOS				
VALIOSA	145 ab	157 ab	138 ab	157 ab	125 b	193 a	21
CONQUISTA	161 a	151 a	72 b	63 b	9 c	6 c	15
			MASSA SECA NÓDULOS (mg $planta^{-1}$)				
VALIOSA	380 a	440 a	460 a	500 a	420 a	430 a	12
CONQUISTA	590 ab	610 a	500 b	260 c	20 d	10 d	15

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Trichez et al. (2007) verificaram que uma ou duas aplicações de glifosato na dosagem de 1 kg ha^{-1} em soja BRS 244 RR, resultou em menor massa de nódulos, sem no entanto, afetar os teores de nitrogênio total da planta. Dados relevantes foram encontrados por Reddy e Zablotowicz (2003). Os autores estudaram os efeitos de uma aplicação ou duas aplicações de glifosato nos estádios V2 ou V2 e V4 na soja e constataram que número de nódulos não foi afetado, porém a massa desses foi reduzida (21% a 28%) em todos os tratamentos onde houve aplicação de glifosato. Esses autores sugerem que redução na massa dos nódulos sem a diminuição no número deles indica que o glifosato poderia estar inibindo o desenvolvimento dos mesmos, mas não a sua formação. Malty et al. (2006) observaram que a aplicação do glifosato em soja transgênica aumentou o número e diminuiu o peso dos nódulos.

Huber (2007) cita que a massa de nódulos na soja transgênica é menor que na soja convencional quando não há aplicação de glifosato, e os resultados das tabelas 10, 11 e 12 comprovam esta afirmação. O autor infere também que o glifosato pode interferir na sinalização dos flavonóides, necessária para o ancoramento dos rizóbios junto às raízes. Nos experimentos relatados na presente dissertação, as sementes inoculadas de soja foram germinadas em areia inerte e o transplante para solução nutritiva só ocorreu 15 dias após a semeadura, portanto as raízes já estavam noduladas quando as plântulas foram transplantadas,

não havendo assim, a interferência do herbicida no processo de nodulação. No presente experimento, provavelmente há diferenças genéticas entre as variedades em estudo, mesmo essas sendo isogênicas, pois as discrepâncias encontradas são independentes da ação do herbicida. Para Nodari e Guerra (2001), as plantas transgênicas podem causar alterações diretas e indiretas sobre os organismos do solo e sobre alguns processos por eles mediados, alterando os exsudados radiculares e, conseqüentemente, interferindo na nodulação.

Apesar de vários estudos indicarem a toxicidade do glifosato para a população de microrganismos do solo, Moorman (1989) relatou que as aplicações de herbicidas em doses recomendadas não reduzem as populações de *Bradyrhizobium* sp. abaixo do nível necessário para uma nodulação adequada, dados esses, que corroboram com os estudos realizados pela Monsanto, a qual afirma que o glifosato utilizado nas doses recomendadas em bula não causa danos sobre a microbiota do solo.

Tabela 11 - Número e massa seca dos nódulos no Experimento 3, nas variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução.

DOSES DE GLIFOSATO	0	2µm L^{-1}	4µm L^{-1}	8µm L^{-1}	16µm L^{-1}	32µm L^{-1}	CV (%)
NÚMERO DE NÓDULOS							
VALIOSA	106 b	136 ab	176 a	109 b	144 ab	108 b	18
CONQUISTA	132 a	129 a	139 a	108 a	51 b	30 b	19
MASSA SECA NÓDULOS (mg planta^{-1})							
VALIOSA	240 d	310 bc	350 b	340 b	260 cd	430 a	10
CONQUISTA	410 a	400 a	480 a	400 a	250 b	80 c	14

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No experimento 1 foi realizado comparação do efeito do herbicida em duas épocas e dois modos distintos de aplicação do produto; a primeira em solução nutritiva na época do transplante das plântulas, estádio V2, (Valiosa e Conquista pré-emergência) e a segunda aplicação, via foliar, no estádio V5, (Valiosa e Conquista pós-emergência). A literatura indica que os herbicidas podem ser aplicados tanto pontualmente quanto em hidroponia. Foi possível constatar que a aplicação do glifosato para a variedade Conquista em pré-emergência teve efeitos mais severos que aplicações foliares, pós-emergentes. A idade das plantas pode ser responsável pela maior resposta à aplicação, pois quanto mais jovens estavam as plântulas, maior efeito deletério à ação do herbicida. Outra explicação poderia ser porque o glifosato em V2 foi aplicado diretamente em solução nutritiva estando, portanto, em contato direto com a raiz.

Tabela 12 - Número de nódulos no Experimento 1, nas variedades Conquista e Valiosa, em duas épocas distintas de aplicação do herbicida glifosato.

	NÚMERO DE NÓDULOS						
DOSES DE GLIFOSATO	**0**	**2µm L^{-1}**	**4µm L^{-1}**	**8µm L^{-1}**	**16µm L^{-1}**	**32µm L^{-1}**	**CV (%)**
VALIOSA PRÉ[1]	192 ab	208 a	208 a	187 ab	131 bc	87c	14
VALIOSA PÓS[2]	232 ab	172 bc	250 a	238 a	170 bc	105 d	12
CONQUISTA PRÉ[1]	217 a	246 a	126 b	82 c	27 d	5 d	13
CONQUISTA PÓS[2]	246 a	153 bc	190 ab	177 bc	121 c	123 bc	15

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. [1] Pré: glifosato aplicado no estádio V2, na solução nutritiva; [2] Pós: glifosato aplicado no estádio V5, por pulverização foliar

6.7 Efeito do glifosato sobre a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

Como pode ser observado pela Tabela 13, constata-se pela análise da atividade da enzima nitrogenase pelo método de redução de acetileno, que houve redução de mais de 99% na atividade dessa enzima na variedade Conquista entre a testemunha e o tratamento com a

dose mais elevada do herbicida em solução (tratamento 5). É possível observar que, entre a testemunha e o tratamento 3, já havia ocorrido redução de 55% na atividade da enzima.

Tabela 13 - Atividade da enzima nitrogenase no Experimento 2, nas variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução.

ATIVIDADE DA NITROGENASE (µmol de C_2H_4 planta^{-1} h^{-1})							
DOSES DE GLIFOSATO	**0**	**2µm L^{-1}**	**4µm L^{-1}**	**8µm L^{-1}**	**16µm L^{-1}**	**32µm L^{-1}**	**CV (%)**
VALIOSA	19657 ab	21476 ab	16859 ab	22494 ab	24421 a	13797 b	25
CONQUISTA	24009 a	19074 ab	22333 ab	15711 b	300 c	86 c	27

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Como foi relatado anteriormente, a atividade da nitrogenase apresentou drástica redução na variedade Conquista, o que está de acordo com os relatos da literatura, uma vez que esta variedade não apresenta a enzima EPSPs tolerante ao herbicida glifosato. A EPSPs é específica no metabolismo dos aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, tirosina e triptofano (BERVALD, 2006). Com a inibição desta enzima, a planta não produz os aminoácidos para a síntese de proteínas e alguns metabólitos secundários, acumulando como composto intermediário, o chiquimato, o qual provoca um colapso no metabolismo intermediário dos tecidos vegetais. A ligação e inibição do glifosato à enzima também acontece no citoplasma, tendo como conseqüência redução na eficiência fotossintética (TREZZI et al., 2001). Por isso há redução na biomassa de raízes e nódulos, afetando a FBN em variedades de soja convencional, como é o caso da Conquista.

A literatura indica que a soja tolerante ao herbicida glifosato apresenta dupla expressão da enzima EPSPs, uma original da espécie e outra da *Agrobacterium* sp,, a qual não é afetada pelo herbicida (BERVALD, 2006) e a via do chiquimato não sendo afetada, não há redução de biomassa em plantas transgênicas.

Observa-se na Tabela 13 redução de 30% na atividade da enzima nitrogenase entre os tratamentos testemunha e o 5, o que evidencia a sensibilidade do *Bradyrhizobium* sp. para doses elevadas desse herbicida. King et al. (2001) constataram que o glifosato pode provocar intoxicação em estirpes de rizóbios prejudicando a nodulação da soja, mas a maioria dessas evidências tem sido descritas a partir de ensaios em que as estirpes são colocadas diretamente em contato com o herbicida. Ao contrário, estudos da Monsanto indicam que a população de microrganismos pode adaptar-se à aplicação do glifosato, tornando-se pouco sensível à sua presença, sendo capaz de crescer satisfatoriamente mesmo em concentrações elevadas do produto.

Como é possível visualizar na tabela 14, não houve diferença significativa nos dados de taxa de FBN na Valiosa. Apesar de haver redução na atividade da nitrogenase no tratamento 5, esta não foi afetada a ponto de interferir na taxa da FBN para o mesmo tratamento. Mesmo na Conquista, o efeito do herbicida na taxa de FBN apareceu apenas nas doses mais elevadas do produto, tratamentos 4 e 5. Apesar de relatos de que *Bradyrhizobium japonicum* sejam sensíveis a esse herbicida, não houve evidências, neste trabalho, dos efeitos do produto sobre a FBN em soja transgênica.

Tabela 14 - Taxa da FBN (%), medidas por redução de acetileno no Experimento 2, nas variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução.

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (%)							
DOSES DE GLIFOSATO	**0**	**2µm L^{-1}**	**4µm L^{-1}**	**8µm L^{-1}**	**16µm L^{-1}**	**32µm L^{-1}**	**CV (%)**
VALIOSA	24 a	26 a	23 a	28 a	31 a	19 a	28
CONQUISTA	27 a	29 a	38 a	31 a	1,8 b	0,3 b	28

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Trichez et al. (2007) verificaram que uma ou duas aplicações de glifosato na dosagem de 1 kg ha^{-1} em soja BRS 244 RR, resultou em redução na FBN sem, no entanto, afetar os teores de nitrogênio total da planta.

É evidente que a taxa de FBN foi baixa para uma leguminosa como a soja, que chega a retirar mais de 80% do N que necessita através desse processo. Observa-se na Tabela 14 que a FBN medida no experimento 2, pelo método de redução de acetileno, não chegou a 40%, metade do que poderia estar fixando. Esses dados podem estar evidenciando que a quantidade de N aplicado em solução nutritiva foi suficientemente alta para que a cultura requisitasse o N na forma de nitrato diretamente da solução, uma vez que a FBN é um processo dispendioso e gasta muita energia.

No entanto, pode-se observar na Tabela 15 que a taxa da FBN medida no experimento 3, pela determinação isotópica de ^{15}N, foi maior que a obtida no experimento 2. Uma possível explicação para esse fato pode ser a fornecida por Saito (1982) que afirmou que erros de 5 a 6% nas conversões das medidas de acetileno para obtenção das taxas da FBN (%) são comuns e considerados erros experimentais e de manuseio. Afirmou, ainda, que as medidas de fixação de $^{15}N_2$ são mais consistentes e menos variáveis que as de redução de C_2H_2. Entretanto, assim como nos dados obtidos no experimento 2, observa-se que as taxas de FBN para o experimento 3 não ultrapassaram 50% do N total acumulado pela planta.

Tabela 15 - Taxa da FBN (%), medidas por determinação isotópica de N no Experimento 3, nas variedades Conquista e Valiosa, sob aplicação de doses crescentes de glifosato em solução.

	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (%)						
DOSES DE GLIFOSATO	**0**	**2µm L^{-1}**	**4µm L^{-1}**	**8µm L^{-1}**	**16µm L^{-1}**	**32µm L^{-1}**	**CV (%)**
VALIOSA	9 c	15 c	27 b	28 b	30 b	50 a	23
CONQUISTA	43 a	36 abc	39 ab	31 abc	23 c	25 bc	22

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se na Tabela 15 que a FBN para a Valiosa aumentou com doses crescentes do herbicida em solução nutritiva, fato que possivelmente está relacionado aos efeitos negativos do glifosato nas raízes das plantas dessa variedade, diminuindo assim, a absorção do N em solução, aumentando a taxa de fixação de N realizada pelos nódulos.

Já na variedade Conquista o mesmo efeito não foi observado, uma vez que tanto o número quanto a massa seca dos nódulos foram reduzidos em tratamentos com o glifosato (Tabela 11), evidenciando que o herbicida influenciou, nessa variedade, tanto a absorção radicular de N quanto o número e massa seca dos nódulos. Os dados de nodulação obtidos no experimento 3 foram maiores que os do experimento 2, por esse motivo, as taxas de FBN também foram maiores para o primeiro.

Para King (2001), a soja plantada em áreas bem drenadas aparentemente não sofre queda nas taxas de FBN e não têm a biomassa e o acúmulo de N afetados em longo prazo. O autor não encontrou nenhuma diferença na biomassa total e no acúmulo de N entre as plantas transgênicas que receberam tratamento com glifosato das testemunhas aos 40 DAE, sugerindo que as plantas se recuperam depois da aplicação do herbicida. O mesmo foi descrito por Santos (2004), que observou recuperação das plantas quando essas atingiram o florescimento.

7. CONCLUSÕES

✓ O herbicida glifosato afetou negativamente a produção de massa seca e a produtividade da soja convencional Conquista, mas não foram evidenciados efeitos na produção de massa seca e na produtividade da soja Valiosa, tolerante ao herbicida;

✓ As taxas de fotossíntese e transpiração não foram influenciadas pela aplicação do glifosato em ambas as variedades de soja estudadas;

✓ O acúmulo de macro e micronutrientes para a Conquista foi drasticamente reduzido com as doses do glifosato aplicadas em solução;

✓ O acúmulo de Cu e Zn foi afetado negativamente na Valiosa quando essas foram submetidas a tratamentos com o herbicida em solução;

✓ O herbicida afetou a atividade da enzima nitrogenase e, conseqüentemente, as taxas de FBN na soja Conquista;

✓ O herbicida afetou a atividade da enzima nitrogenase na soja Valiosa, muito embora não foi observado conseqüências nas taxas de FBN.

REFERÊNCIAS

AGROCLUBES. **Clube da soja**. Ficha técnica. São Paulo, 2001.

AMARANTE JÚNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.4, p.589-593, jul-ago. 2002.

AZEVEDO, J.L.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, C.M.L. Transgênicos e evolução dirigida. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p.451-464, jul-out. 2000.

BARTELS, P.G. Effects of herbicides on chloroplast and cellular development. In: DUKE, S.O. **Weed physiology**. Boca Raton: CRC Press, 1985. v.2, p.64-91.

BATAGLIA, O.C.; DECHEN, A.R.; SANTOS, W.R. Princípios da diagnose foliar. In: ALVAREZ, V.H.V.; FONTES, E.E.F.; FONTES, M.P.F. (Org.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa: SBCS; UFV, 1996. p.647-660.

BATAGLIA, O.C.; MASCARENHAS, H.A.A.; TEIXEIRA, J.P.F.; TISSELI FILHO, O. Acúmulo de matéria seca e nutrientes, em soja cultivar Santa-Rosa. **Bragantia**, Campinas, v.35, n.21, p.237-247, jul. 1976.

BERVALD, C.M.P. **Herbicidas inibidores da EPSPs**: efeitos sobre a qualidade fisiológica da semente, tolerância e crescimento de plantas de soja cvs. convencional e transgênica. 2006. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

BRAMMALL, R.A.; HIGGINS, V.J. The effect of glyphosate on resistence of tomato to *Fusarium* crown and root rot disease and on the formation of host structural defensive barriers. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p.1547-1555, ago. 1988.

BUFFIN, D.; JEWELL, T. **Health and environmental impacts of glyphosate**: The implications of increased use of glyphosate in association with genetically modified crops. London: Pesticide Action Network UK, 2001. Disponível em: <www.foe.co.uk/resource/reports/impacts_glyphosate.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2008.

BURNSIDE, O.C. Rationale for developing herbicide resistant crops. **Weed Technology**, Champaign, v.6, n.3, p.621-625, 1992.

CAKMAK, I. Efeitos do glifosato na nutrição de micronutrientes de plantas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.119, p.5-8, set. 2007.

CARLISLE, S.M.; TREVORS, J.T. Glyphosate in the environment. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v.39, n.4, p.409-420, jun. 1988.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais:** metabólitos secundários. 1. ed. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda., 2001. 104p.

CHAKRAVARTY, P.; CHATARPAUL, L. Non-target effect of herbicides: I. Effect of glyphosate and hexazinone on soil microbial activity - Microbial population, and in-vitro growth of ectomycorrhizal fungi, **Pesticide Science**, London, v.28, n.3, p.233-241, 1990.

COBB, A. **Herbicides and plant physiology**. 1. ed. London: Chapman and Hall, 1992. 176p.

COÊLHO, S.R.F. **Crescimento e fixação de nitrogênio em plantios mistos de eucalipto e leguminosas arbóreas nativas**. 2006. 56f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBio. **Relatório 2002**. Brasília, 2002. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/1146.html>. Acesso em 14 ago. 2008.

COSTA, A.C. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de soja à atmosfera enriquecida com CO_2 e à restrição hídrica**. 2003. 48p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

COUPLAND, D.; PEABODY, D.V. Absorption, translocation, and exudation of Glyphosate, Fosamine and Amitrole in Field Horsetail (*Equisetum arvense*). **Weed Science**, Ithaca, v.29, p.556-560, set. 1981.

DEON, M.D. **Crescimento e nutrição mineral da soja submetida a excesso de P, S, K, Ca e Mg em solução nutritiva.** 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

DEVINE, M.; DUKE, S.O.; FEDTKE, C. Inhibition of amino acid biosynthesis. In: _____. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: Prentice Hall, 1993. cap.13, p.251-294.

DUKE, S.O.; HOAGLAND, R.E. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds: Phenylalanine ammonialyase activity, free amino acids Root-fed amino acids and glyphosate toxicity in soybean (*Glycine max*) seedlings. **Weed Science**, Ithaca, v.29, p.297-302, 1981.

DUKE, S.O.; RIMANDO, A.M.; PACE, P.F.; REDDY, K.N.; SMEDA, R.J. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, n.1, p.340-344, 2003.

DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Impact of GM Crops on microbial Biodiversity. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.33, n.3, p.806-815, mai. 2004.

DYER, W.E.; HESS, F.D.; HOLT, S.S.; DUKE, S.O. Potential benefits and risks of herbicide-resistant crops produced by biotechnology. **Hortscience Review**, Virginia, v.15, p.367-371, 1993.

EBERBACH, P.L.; DOUGLAS, L.A. Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.119, n.1, p.15-23, set.1989.

ELLSTRAND, N. C. Dangerous liaisons: when cultivated plants mate with their relatives. **Baltimore, MD**, Baltimore, 268 p., 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Soja em números** (safra 2007/2008). Londrina: Embrapa Soja, 2008. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=16>. Acesso em: 05 fev. 2009.

ERISMANN, N.M.; MACHADO, E.C.; GODOY, I.J. Capacidade fotossintética de genótipos de amendoim em ambiente natural e controlado, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.7, p.1099-1108, jul. 2006.

FAGAN, E.B.; MEDEIROS, S.L.P.; MANFRON, P.A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; LIER, Q.J.; SANTOS, O.S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.14, n.1, p.89-106, 2007.

FEI, H.; VESSEY. J.K. Further investigation of the roles of auxin and cytokinin in the NH_4 1-induced stimulation of nodulation using white clover transformed with the auxin-sensitive reporter GH3: gusA. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.121, p.674–681, mar. 2004.

FONTES, E.G.; SANTOS, I.K.S.M.; GAMA, M.I.C. A biossegurança de plantas cultivadas transgênicas. In: TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança**. **Uma abordagem multidisciplinar**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996. p.313-327.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1998. 72p.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: Monsanto do Brasil, 2005. 60p.

GAZZIERO, D.L.P.; PRETE, C.E.C. Resistência é a questão. **Revista Cultivar**, Pelotas, n.4, p.22-24, 2004.

GAZZIERO, D.L.P.; MACIEL, C.D.G.; SOUZA, R.T.; VELINI, E.D.; PRETE, C.E.C.; OLIVEIRA NETO, W. Deposição de glyphosate aplicado para controle de plantas daninhas em soja transgênica. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.24, nº1, p.173-181, 2006.

GONZALEZ, A.; GONZALEZ, C.M.; ROYUELA, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with Pea (*Pisum sativum*). **Weed Science**, Ithaca, v.44, n.1, p.31-37, jan-mar.1996.

GORDON, B. Adubação com manganês em soja convencional e soja resistente ao glifosato. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.117, p.6-7, mar. 2007.

GREENPEACE BRASIL. **O contexto político dos transgênicos no Brasil**. Abril 2005. São Paulo, 2005. Disponível em: <http://www.greenpeace.org/raw/content/brasil/documentos/transgenicos/greenpeacebr_050430_transgenicos_documento_contexto_politico_port_v1.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2008.

GROSSBARD, E.; HARRIS, D. Effects of herbicides on the decay of straw. In: GROSSBARD, E. (Ed.). **Straw decay and its effect on disposal and utilization**. Chichester: John Wiley and Sons, 1979. p.167-176.

GRUYS, K.J.; SIKORSKI, A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B.K. (Ed.). **Plant amino acids** - biochemistry and biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1999. p.357-365.

HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**. Rockville, v.43, n.8, p.1185-1207, ago. 1968.

HERNANDEZ, A.; GARCIA, J.I.P.; BACERRIL, J.M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merril). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.47, n.7, p.2920-2925, mai. 1999.

HO, M.W.; TRAAVIK, T.; OLSVIK, O.; TAPPESER, B.; HOWARD, C.V.; WEIZSACKER, C.; MCGAVIN, G.C. Gene technology and gene ecology of infectious diseases. **Microbial Ecology in Health and Disease**, Stockholm, v.10, n.1, p.33-59, jan. 1998.

HOLLÄNDER, H.; AMRHEIN, N. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate: I. Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Plant Physiology,** Rockville, v.66, n.5, p.823-829, nov. 1980.

HUBER, D. Efeitos do glifosato em doenças de plantas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.119, p.13-15, mar. 2007.

IFT EXPERT REPORT. Human food safety evaluation of rDNA biotechnology derived foods. **Food Technology**, Chicago, v.54, n.9, p.53-61, 2000.

JOHNSON, C.M.; STOUT, P.R.; BROYER, T.C.; CARTON, A.B. Comparative chlorine requirements of different plant species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.8, n.4, p.337-353, mai. 1957.

KING, C.A.; PURCELL, L.C. Inhibition of N_2 fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. **Plant Physiology**, Rockville, v.137, n.4, p.1389-1396, abr. 2005.

KING, C.A.; PURCELL, L.C.; VORIES, E.D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. **Agronomy Journal**, Madison, v.93, n.1, p.179-186, jan. 2001.

KISHINEVSKY, B.; LOBEL, R.N.; LIFSHITZ, D.G. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. **Weed Research**, Oxford, v.28, n.4, p.291-296, ago. 1988.

KITCHEN, L.M.; WITT, W.W.; RIECK, C.E. Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. **Weed Science**, Ithaca, v.29, p.513-516, 1981.

KLEBA, J.B. Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: o caso da soja RR da Monsanto. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.15, n.3, p.9-42, set-dez. 1998.

KRUSE, N.D.; TREZZI, M.M.; VIDAL, R.R. Herbicidas inibidores da EPSPs: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v.1, n.2, p.139-146, 2000.

LAVRES JÚNIOR, J. **Combinações de doses de nitrogênio e potássio para o capim-Mombaça**, 2001. 115p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

LEITE, M. Arautos da razão: a paralisia no debate sobre transgênicos e meio ambiente. **Novos Estudos**, São Paulo, n.78, p.41-47, jul. 2007.

LÉVESQUE, C.A.; RAHE, J.E.; EAVES, D.M. Effect of glyphosate on *Fusarium* spp.: Its influence on root colonization of weeds, propagule density in the soil, and crop emergence. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.33, n.5, p.354–360, mai. 1987.

LIU, C.M.; MCLEAN, P.A.; SOOKDEO, C.C.; CANNON, F.C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.57, n.6, p.1799-1804, jun. 1991.

LYSON, T.A. Advanced agricultural biotechnologies and sustainable agriculture. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.20, n.5, p.193-196, mai. 2002.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional de plantas:** princípios e aplicações. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MALKONES, H.P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities - a review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.8, p.781-789, 2000.

MALLIK, M.A.B.; TESFAI, K. Pesticidal effect of soybean rhizobia symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.85, n.1, p.33-41, fev. 1985.

MALTY, J.D.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.D. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.285-291, fev. 2006.

MATHEWS, C.K.; HOLDE, K.E. **Biochemistry**. Benjamin Redwood City: Cummings, 1990. 1130p.

McGREGOR, S.E. Insect pollination of cultivated crop plants. In: USDA. **Agricultural handbook**. Washington, D.C., 1976. p. 411.496

MONQUERO, P.A. **Dinâmica populacional e mecanismos de tolerância de espécies de plantas daninhas ao herbicida glyphosate**. 2003. 111f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

_____. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: Situação e perspectivas. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.4, p.517-531, ago. 2005.

MOORMAN, T.B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. **Weed Science**, Ithaca, v.34, n.4, p.628-633, jul. 1986.

_____. A review of pesticide effects on microorganisms and microbial processes related to soil fertility. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v.2, n.1, p.14-23, 1989.

MORGANTE, P.G. Fixação Biológica e assimilação de nitrogênio. 2008. Disponível em: <quimica10.com.br/?p=510 >. Acesso em: 03 mar. 2008.

MOUSDALE D.M.; COGGINS J.R. Amino acid sinthesis In: KIRKWOOD, R.C. **Target sites for herbicide action.** London: Plenum Press, 1991. p.29-39.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.18, n.1, p.91-116, jan-abr. 2001.

NUKUI, N.; EZURA, H.; YUHASHI, K.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K. Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosyntheses and perception and nodulation in *Lotus japonicus* e *Macroptilium atropurpureum*. **Plant Cell Physiology,** Oxford, v.41, n.7, p.893-897, jul. 2000.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; DVORANEN, E.C.; CONSTANTIN, J.; CAVALIERI, S.D.; FRANCHINI, L.H.M.; RIOS, F.A.; BLAINSKI, E. Influência do glyphosate sobre a nodulação e o crescimento de cultivares de soja resistente ao glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.26, n.4, p.831-843, jun. 2008.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; VALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, V.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B.; KISHORE, G.M. Development, identification, and characterization of a glyphosate tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v.35, n.5, p.1451-1461, set. 1995.

PEREIRA, J.H. **Estudo estrutural de enzimas da via metabólica do ácido chiquímico de *Mycobacterium tuberculosis***. 2005. 171p. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2005.

PRADO, C.H.B.A.; CASALI, C.A. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em folhas de ramos destacados de eucalipto. In: _____. **Fisiologia vegetal**: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral. Barueri: Manole, 2006. p.1-18.

REDDY, K.N.; HOAGLAND, R.E.; ZABLOTOWICZ, R.M. Effect of glyphosate on growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) varieties. **Journal of New Seeds**, London, v.2, n.3, p.37-52, jan. 2001.

REDDY, K.N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate treated, glyphosate resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, n.16, p.5139-5143, jul. 2004.

REDDY, K.N.; ZABLOTOWICZ, R.M. Glyphosate resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**, Ithaca, v.51, n.4, p.496-502, jul-ago. 2003.

RICHARD JÚNIOR, E.P.; SLIFE, F.W. In vivo and in vitro characterization of the foliar entry of glyphosate in hemp dogbane (*Apocynum cannabinum*). **Weed Science**, Ithaca, v.27, n.4, p.426-433, 1979.

RISSLER, J.; MELON, M. **The ecological risks of engineered crops**. Massachusetts: The MIT Press, 1996. 182p.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: Grafmarke, 2005. 591p.

SAITO, S.M.T. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium Phaesoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, nº 7, p.999-1006, jul. 1982.

SAITO, S.M.T.; MATSUI, E.; SALATI, E. $^{15}N_2$ fixation, H_2 evolution and C_2H_2 reduction relationships in *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum,** Kobenhavn, v.49, n.1, p.37-42, mai. 1980.

SANTINONI, I.A. **Avaliação do impacto ambiental da soja transgênica resistente ao glifosato sobre alguns grupos funcionais de microrganismos do solo.** 2008. 67p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

SANTOS, J.B.; JACQUES, R.J.S.; PROCÓPIO, S.O.; KASUYA, M.C.M.; SILVA, A.A.; SANTOS, E.A. Efeitos de diferentes formulações comerciais de glyphosate sobre estirpes de *Bradyrhizobium*. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.2, p.293-299, abr-jun. 2004.

SANTOS, J.B.; FERREIRA, E.A.; REIS, M.R.; SILVA, A.A.; FIALHO, C.M.T.; FREITAS, M.A.M. Avaliação de formulações de glyphosate sobre soja Roundup Ready. **Planta Daninha**, Viçosa, v.25, n.1, p.165-171, jan-mar. 2007.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas.** Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química, 1974. 54p.

SCHMIDT, J.S.; HARPER, J.E.; HOFFMAN, T.K.; BENT, A.F. Regulation of soybean nodulation independent of ethylene signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, n.3, p.951-959, mar. 1999.

SHANER, D.L. Effects of glyphosate on transpiration. **Weed Science**, Ithaca, v.26, n.5, p.513-516, set. 1978.

SILVA, D.H. **Boro em mamoneira**: aspecto morfológico e fisiológicos relacionados à deficiência e toxicidade. 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SILVEIRA, J.A.G.; CONTADO, J.L.; RODRIGUES, J.L.M.; OLIVEIRA, J.T.A. Nodulin activities in relation to nodule development and nitrogen fixation in common bean. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Berlin, v.1, n.5, p.45-52, 1999.

SIQUEIRA, J.O.; TRANNIN, I.C.B.; RAMALHO, M.A.P.; FONTES, E.M.G. Interferências no agrossistema e riscos ambientais de culturas transgênicas tolerantes a herbicidas e protegidas contra insetos. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.21, n.1, p.11-81, jan-abr. 2004.

SIQUEIRA, S.C.; MOREIRA, M.A.; MOSQUIM, P.R.; JOSÉ, I.C.; FERREIRA, F.A.; SEDIYAMA, C.S. Simulação da soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por meio do cultivo de explantes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.11, n.1, p.13-20, jun. 1999.

SMITH, F.W.; LONERAGAN, J.F. Interpretation of plant analysis: concepts and principles. In: REUTER, D.J.; ROBINSON, J.B. (Ed.). **Plant analysis**: an interpretation manual. Collingwood: CSIRO, 1997. cap.1, p.1-33.

SOUZA, A. Transgênicos: a polêmica nas lavouras. **Panorama Rural**, São Paulo, v.1, p.20-25, 1999.

TAVARES, C.R.O. **Síntese do glifosato marcado com nitrogênio-15**, 2006, 86p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

TIEDJE, J.M.; COLWELL, R.K.; GROSSMAN, Y.L.; HODSON, R.E.; LENSKI, R.E.; MACK, R.N.; REGAL, P.J. The planned introduction of genetically engineered organisms – Ecological considerations and recommendations. **Ecology**, Brooklyn, v.70, n.2, p.298-315, abr. 1989.

TILLMANN, M.A.A.; WEST, S. Identification of genetically modified soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds resistant to glyphosate. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n.3, p.336-341, mai-jun. 2004.

TORRES NETTO, A.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J.G.; YAMANISHI, O.K. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.14, n.3, p.203-210, jul. 2002.

TREZZI, M.M.; KRUSE, N.D.; VIDAL, R.A. Inibidores de EPSPS. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO JUNIOR, A. (Ed.). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. p.37-45.

TRICHEZ, D.; BOHM, G.; ROMBALDI, C.V. Efeito do glifosato na fixação biológica de nitrogênio em soja modificada geneticamente. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, PESQUISA E RESPONSABILIDADE AMBIENTAL, 16., 2007, Pelotas. **Anais...** Pelotas, 2007. 1 CD-ROM.

TRIVELIN, P.C.O. **Medida da fixação simbiótica do nitrogênio marcando-se a atmosfera do solo com $^{15}N_2$ a baixo enriquecimento isotópico**. 1983. 162f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983.

VIDAL, R.A. **Herbicidas**: mecanismos de ação e resistência de plantas. Porto Alegre: Ribas Vidal, 1997. 165p.

WHIGHAM, D.K.; STOLLER, E.W. Soybean desiccation by paraquat, glyphosate and ametryn to accelerate harvest. **Agronomy Journal**, Madison, v.71, n.4, p.630-633, 1979.

WOLFENBARGER, L.L.; PHIFER, P.R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. **Science**, Washington, v.290, n.5499, p.2088-2093, dez. 2000.

WOODWORTH, C.M. A extensão da polinização cruzada natural na soja. **Journal of the American Society of Agronomy**, Madison, v.14, p.278-283, 1992.

YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S.; VITTI, G.C. Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**.** Piracicaba: POTAFOS; IPNI, 2007. 722p.

YAMADA, T.; CASTRO, P.R.C. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.119, p.1-32, 2007. (Encarte Técnico).

ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.33, n.3, p.825-831, mai-jun. 2004.