

EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE A FIXAÇÃO DE ¹⁵N EM SOJA TRANSGÊNICA E CONVENCIONAL

LEILA APARECIDA FIGUEIREDO¹, DENIS HERISSON DA SILVA², ANTONIO ENEDI BOARETTO¹ e VICTOR SANCHES RIBEIRINHO³

RESUMO: O Brasil é um grande produtor de soja e sua produção deve-se ao plantio direto, utilizando cultivares transgênicas resistentes ao glifosato ou convencionais. Pouco se sabe sobre os efeitos do glifosato na soja transgênica, considerando doses elevadas e suas consequências na fixação biológica de nitrogênio (FBN). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do glifosato sobre a nutrição nitrogenada de duas cultivares de soja: 'BRS Conquista' e 'BRS Valiosa RR', sob doses de 0 μ M; 2 μ M; 4 μ M; 8 μ M; 16 μ M e 32 μ M do glifosato em solução nutritiva, com cinco repetições. O experimento realizado em casa-de-vegetação consistiu em um delineamento experimental inteiramente ao acaso. Avaliou-se a produção de matéria seca da planta, nódulos, índice SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) para medição indireta de clorofila, acúmulo de N na parte aérea e a FBN, com a utilização da técnica de abundância isotópica de ¹⁵N. Houve correlação positiva em relação à FBN, índice SPAD e matéria seca total na cultivar Valiosa, e negativa para a 'Conquista'. Os resultados de abundância isotópica de ¹⁵N mostraram menor absorção de N da solução nutritiva nas doses elevadas pela soja RR, portanto, conclui-se que, embora a soja transgênica seja resistente ao herbicida e não influi na FBN, a quantidade absorvida de N disponível na solução nutritiva é menor quando comparada com a testemunha.

Termos para indexação: nodulação, nutrição nitrogenada, herbicida.

EFFECTS OF GLYPHOSATE ON THE (¹⁵N) NITROGEN FIXATION IN TRANSGENIC AND CONVENTIONAL SOYBEAN

ABSTRACT: Brazil is a great world's exporter of soybean and farmers have the highest percentage of planted areas with no-till system, using both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant transgenic plants. There were little data about glyphosate deleterious effects in transgenic soybean as well as its consequences in biological nitrogen fixation (BNF) rates in high doses in nutrient solution. This research aimed to describe glyphosate effects in nitrogen nutrition in two cultivars of soybeans: 'BRS Conquista' and 'BRS Valiosa RR', in six doses of the herbicide: 0 μ M; 2 μ M; 4 μ M; 8 μ M; 16 μ M and 32 μ M in nutrient solution with five replications. The trial was carried on greenhouse conditions, in a completely randomized design. Dry matter yield of plant and nodules and SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) index for evaluation of chlorophyll contents were evaluated. Total N content and BNF rates were determined using isotopic dilution technique (¹⁵N). There was positive correlation between BNF rates, SPAD index and dry matter yield in Valiosa cultivar, whereas the correlation was negative in Conquista cultivar. The result of ¹⁵N abundance showed lower N absorption in transgenic plant under high doses of glyphosate. Thus it can be concluded that glyphosate did not affect the BNF rates in glyphosate-resistant plant, although the N uptake from the nutrient solution is lower than glyphosate absence.

Index terms: nodulation, nitrogen nutrition, herbicide.

¹Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Avenida Centenário, 303, 13400-970, Piracicaba, SP, lafiguei@cena.usp.br, aeboaret@cena.usp.br

²Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Escritório de Desenvolvimento Rural, Rua Campos

Salles, 507, 13400-200, Piracicaba, SP, denis.silva@cati.sp.gov.br

³Instituto Agrônomo de Campinas, Avenida Barão de Itapura, 1481, 13020-902, Campinas, SP, victor.ribeirinho@gmail.com

INTRODUÇÃO

Originária da China, a soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada em grãos do País, onde sua produção deverá ser a maior da história, com previsão de 75 milhões de toneladas (BRASIL, 2011). O Mato Grosso é um dos poucos estados que ainda têm uma grande área de plantio de soja convencional. No Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, mais de 90% das áreas já são ocupadas por sementes providas de organismos geneticamente modificados (MACIEL, 2011).

O glifosato é um herbicida não seletivo, relativamente pouco tóxico para os animais, permitindo implantação de culturas rotacionadas, como a do milho, soja, feijão, e possibilitando o seu uso em larga escala na agricultura brasileira (ABREU et al., 2008).

Com o desenvolvimento de plantas transgênicas tolerantes a esse herbicida, ele também passou a ser usado em pós-emergência da cultura de interesse (PEREIRA et al., 2007). Muitos trabalhos têm sido realizados para entender o modo de ação do glifosato, mas poucos com a finalidade de estudar seu efeito sobre as populações microbianas do solo, como a população de *Bradyrhizobium japonicum*. Essas populações ocorrem associadas às raízes da soja, exercendo grande influência na nutrição e fisiologia dessa cultura, e conseqüentemente existe a necessidade de estudar a ação do produto sobre a nutrição nitrogenada e a taxa de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).

Os cloroplastos estão diretamente envolvidos na produção de biomassa vegetal, pois nelas ocorre a reação fotossintética. A absorção da energia radiante pelos pigmentos fotossintéticos, a presença de gás carbônico atmosférico e água e as demais reações responsáveis pela produção de moléculas orgânicas dependem de elementos minerais, especialmente o nitrogênio (N). A clorofila é o principal pigmento fotossintético, e sua correlação com a nutrição nitrogenada pode

ser medida por meio do índice SPAD (JESUS; MARENCO, 2008).

Em plantas não transgênicas, o glifosato provoca um colapso no metabolismo dos tecidos vegetais e a morte da planta (BERVALD et al., 2010), mas o efeito na FBN pode alterar vários processos fisiológicos, seja a planta transgênica ou não, pela menor disponibilidade deste nutriente.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do herbicida glifosato sobre produção vegetativa, FBN e a sua relação com a nutrição nitrogenada, utilizando a técnica da diluição isotópica de ^{15}N . A técnica isotópica que emprega o ^{15}N como traçador consiste em fornecer à planta em estudo um composto químico no qual a razão isotópica ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) do composto considerado é diferente da natural e, em seguida, avaliar a distribuição do isótopo no sistema biológico. Portanto, existe a necessidade de utilização de compostos nitrogenada altamente enriquecida no isótopo, graças à diluição isotópica dos sistemas em estudo (BENDASOLLI et al., 2002). Para este trabalho, foram determinadas a medição indireta de clorofila (índice SPAD), a abundância isotópica de ^{15}N e a avaliação da nodulação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em outubro de 2010, em casa-de-vegetação, localizada no Município de Piracicaba, SP, 22°42'30'' S, 47°38'01'' W, 554 m acima do nível do mar; sendo o clima da região classificado, segundo Koeppen, como CWA, subtropical, com inverno seco e temperatura do mês mais quente acima de 22 °C (OMETTO, 1991).

As cultivares de soja estudadas foram: 'BRS Conquista', cultivar não resistente ao glifosato (convencional); 'BRS Valiosa' – soja Roundup Ready®, cultivar tolerante ao glifosato (resistente). Sementes das cultivares, previamente esterilizadas e inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio *Bradyrhizobium japonicum*, foram germinadas em areia

autoclavada e deixadas crescer até alcançarem o estágio V2, após a infecção das raízes pelas bactérias fixadoras de N, quando foram transferidas para solução nutritiva (pH 6,0), enriquecida com 4,3% de átomos em excesso de ¹⁵N, por meio da dissolução dos reagentes K¹⁵NO₃ e Ca(¹⁵NO₃)₂·4H₂O.

Foram utilizados vasos plásticos contendo 2 litros de solução nutritiva, aeradas permanentemente e com reposição diária de água desionizada, conforme a demanda transpiratória. A solução utilizada foi a proposta por Johnson et al. (1957), modificada com a concentração de N reduzida, 1/4 (um quarto) da necessidade de N requerida pela soja, para evitar a interferência do excesso desse nutriente na FBN.

As plântulas foram adaptadas à solução completa por meio do transplante para solução nutritiva contendo 1/5 (um quinto) da concentração de nutrientes. Após quatro trocas sucessivas e crescentes, atingiu-se a concentração final de nutrientes. O experimento foi conduzido com as duas cultivares de soja (Conquista e Valiosa) e 6 doses de glifosato: testemunha (sem aplicação de glifosato); 2 μM; 4 μM; 8 μM; 16 μM e 32 μM de glifosato p.a. (PM = 169), com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado (2 X 6 X 5). As concentrações de glifosato em solução nutritiva foram decrescentes: completa na ocasião do transplante, 50% e 25% nas trocas seguintes, a cada 10 dias, respeitando-se a meia-vida desse herbicida em água (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

O teor de clorofila (unidades SPAD) foi avaliado com o equipamento Minolta (SPAD-502 meter). As avaliações foram realizadas aos 35 dias após a semeadura (V6), entre 9h e 12h. Foram realizadas três leituras por trifólio e computou-se a média das leituras executadas. Após essas avaliações, no estágio do florescimento pleno (R2) – que corresponde à época de maior absorção de nutrientes–, as partes aéreas das plantas foram cortadas rente ao solo, lavadas em

água desionizada, embaladas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C– 70 °C até peso constante, pesadas e moídas em moinho de facas tipo Wiley. As raízes foram lavadas em água corrente e, em seguida, procedeu-se ao destaque e contagem do número de nódulos para posterior secagem do material e determinação da sua matéria seca.

As determinações do teor de N (%) nas amostras de soja cultivadas em solução nutritiva enriquecida com ¹⁵N foram realizadas pela técnica de espectrometria de matérias (espectrômetro Europa Scientific® ANCA-SL 20-20), e a contribuição da FBN foi quantificada para a cultura da soja, conforme as equações a seguir:

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

% NPPS: % de N na planta proveniente da solução nutritiva

a: % de ¹⁵N na planta (% átomos de ¹⁵N)

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

c: % de ¹⁵N 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

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão para o fator quantitativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de matéria seca de planta e nódulos

A matéria seca da parte aérea, raízes e nódulos da cultivar Conquista diminuíram com o aumento da concentração de glifosato na solução nutritiva, pois ela não possui no seu genoma o gene de resistência ao herbicida. Após aplicação do herbicida, ocorre o acúmulo de chiquimato pela inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS). 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 (BERVALD et al., 2010). Este acúmulo provoca um colapso no metabolismo dos tecidos vegetais, e quanto mais glifosato a planta absorve, mais ácido chiquímico ela acumula, provocando a sua morte.

Na cultivar Conquista observou-se redução de 36% e 80% na produção de matéria seca da parte aérea, raiz e nódulos referentes ao tratamento com $32\mu\text{M}$ de glifosato em solução nutritiva (Figuras 1. A e C). Nesta cultivar, foram observadas redução no desenvolvimento das radículas e a formação de inúmeras, no entanto finas, raízes laterais. França-Neto et al. (1998), que também trabalharam com a cultivar Conquista, constataram drástica redução do desenvolvimento das radículas, principalmente secundárias, quando essas plantas receberam aplicações de glifosato. Estudos relatam necrose na raiz primária e desenvolvimento de finas e numerosas raízes laterais depois de 7 a 14 dias após o tratamento com glifosato (GALLI; MONTEZUMA, 2005; ZOBIOLE et al., 2010).

As características de produção da 'Valiosa' são pouco influenciadas pelas doses de glifosato quando comparadas à 'Conquista' (Figuras 1. A e B), o que demonstra a esperada resistência ao herbicida da cultivar geneticamente modificada. Quanto à produção de nódulos, poucos estudos avaliaram a produção desta em soja transgênica, sob o efeito deste herbicida. Em experimento realizado com plantas de soja BRS 242 RR, cultivadas em solo, foram avaliados o número de nódulos e a biomassa seca da parte aérea, da raiz e dos nódulos, bem como foi constatado que estes foram severamente reduzidos pelo efeito do glifosato (ZOBIOLE et al., 2010), contradizendo a correlação positiva encontrada na 'Valiosa' neste trabalho (Tabela 1). Embora a matéria seca de nódulos e de raízes tenham diminuído a partir da dose de $4\mu\text{M}$ de glifosato em solução nutritiva,

tal situação pode ser irreal, pois a maior quantidade do glifosato no solo fica fortemente adsorvido nos coloides, colaborando para sua inativação e indisponibilização para as plantas (GROSSBARD; HARRIS, 1979).

Na 'Valiosa', observou-se aumento na produção de matéria seca na parte aérea (10%) e raiz (30%) com incremento de glifosato em solução nutritiva (Figuras 1. A e B). Mecanismos de adaptação ou resistência podem ter aumentado o metabolismo celular em resposta a este estresse químico, promovendo o aumento de biomassa. Tais aumentos no metabolismo celular em decorrência de estresses de menor magnitude, sejam de origem climática, hídrica, patológica ou mesmo química, foram relatados por Lichtenthaler (1996).

O aumento de matéria seca nos nódulos (83%) na cultivar RR (Figura 1. C) contradiz diversos estudos sobre o efeito do glifosato sobre o rizóbio *Bradyrhizobium japonicum* em diversas condições experimentais (BERVALD et al., 2010; MATALLO et al., 2010; SANTOS et al., 2007; TUFFI SANTOS et al., 2007; ZOBIOLE et al., 2010), embora nenhum destes utilizaram em solução nutritiva.

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 et al., 2010). Assim, não há acúmulo de chiquimato-3-fosfato e consequentemente não há redução de biomassa em plantas transgênicas (TUFFI SANTOS et al., 2007). 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 (SANTOS et al., 2007). Possivelmente, tanto a planta quanto os rizóbios se recuperam dos efeitos negativos provocados pelo herbicida depois de 60 dias após a semeadura. Para King (2001), a soja transgênica plantada em áreas bem drenadas aparentemente não sofre queda nas taxas de

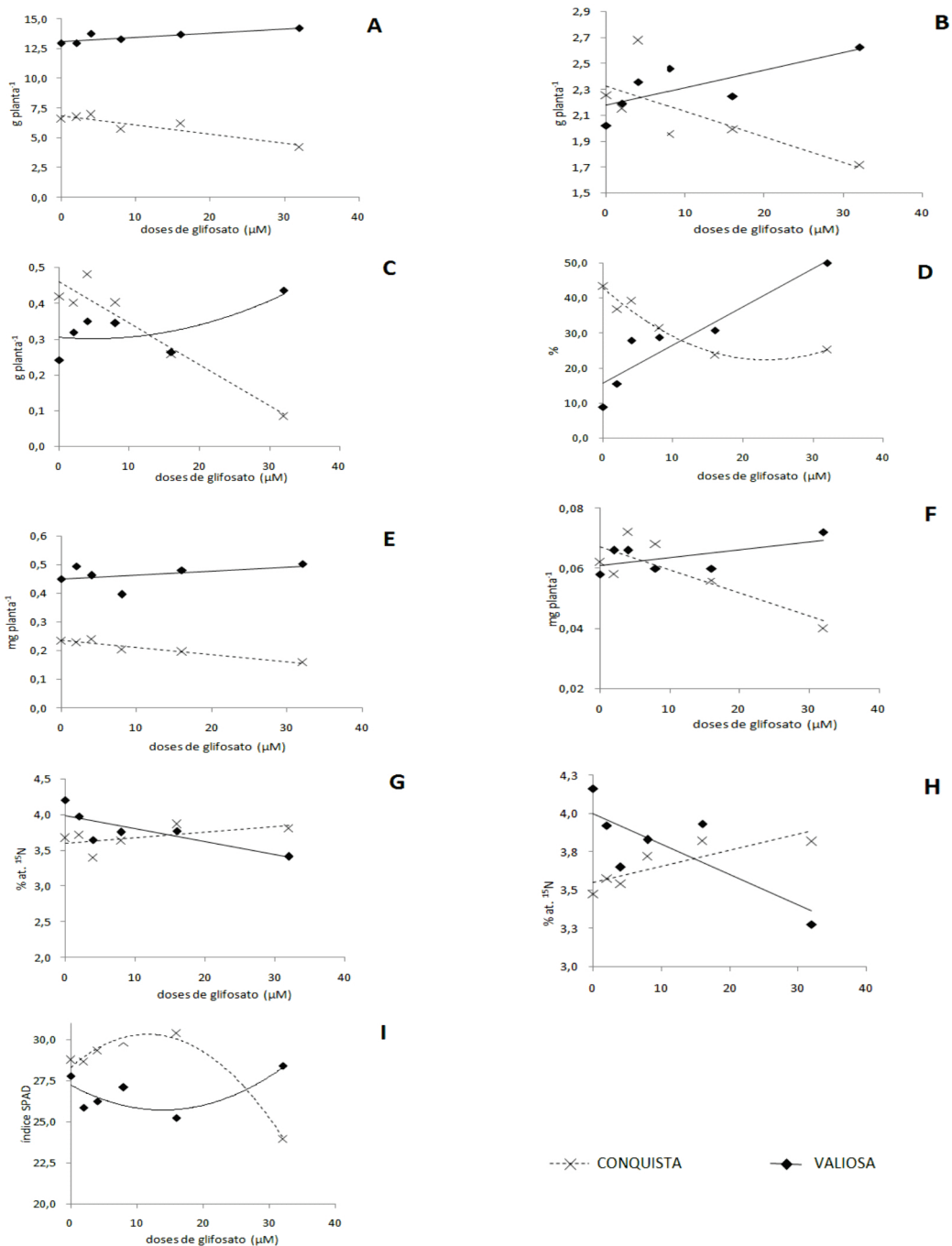


FIG. 1. Representação gráfica de regressão entre concentração de glifosato na solução nutritiva (μM) e os parâmetros citados nas Tabelas 1, 2 e 3.

TABELA 1. Equações de regressão entre concentração de glifosato na solução nutritiva (μM) e produção de matéria seca de soja e de nódulos radiculares (Y , g planta⁻¹).

Gráficos (Figura 1)	Cultivares	Equação		
			r ²	CV(%)
Parte aérea				
A	VALIOSA	$Y = 0,036x + 13,07$	0,75*	8
	CONQUISTA	$Y = -0,077x + 6,84$	0,83*	
Sistema radicular				
B	VALIOSA	$Y = 0,14x + 2,1$	0,60*	11,5
	CONQUISTA	ns		
Nódulos				
C	VALIOSA	$Y = 0,00017x^2 - 0,0016x + 0,3$	0,51*	13
	CONQUISTA	$Y = -0,011x + 0,46$	0,91*	

F: *significativo a 5% de probabilidade.

FBN e não tem a biomassa e o acúmulo de N afetados em longo prazo. O mesmo autor não encontrou diferenças significativas, em relação às testemunhas, na biomassa total e no acúmulo de N entre as plantas transgênicas que receberam tratamento com glifosato aos 40 dias após a emergência, sugerindo que essas plantas se recuperam depois da aplicação do herbicida. Aplicações de herbicidas nas doses recomendadas pelos fabricantes não têm reduzido as populações de *Bradyrhizobium* no solo abaixo do nível necessário para uma nodulação adequada (ZILLI et al., 2007). Vários autores estão de acordo que, dos herbicidas mais utilizados na agricultura, o glifosato é o menos tóxico para a nodulação e FBN (BÖHM; ROMBALDI, 2010), e alguns estudos 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 (GALLI; MONTEZUMA, 2005). Maly et al. (2006) observaram as estirpes de *Bradyrhizobium* BR 29 e INPA 553A em meio de cultura, *in vitro*, e concluíram que estas apresentaram leve estímulo no crescimento em concentrações baixas do glifosato, transcorridas 120 horas após a aplicação do produto, sem inibição em doses elevadas, com crescimento máximo obtido nas concentrações de 89,47 μM e 86,21 μM de

glifosato no meio de cultura. Tais concentrações de glifosato são mais que 10 vezes superiores à concentração esperada no solo, que é de 7 μM (MOORMAN, 1986). Na testemunha, a produção de matéria seca de nódulos na cultivar convencional foi 75% maior do que na cultivar RR (Figura 1. C). Como observado neste estudo, a matéria de nódulos na soja transgênica é menor que na soja convencional quando não há aplicação de glifosato (HUBER, 2007); provavelmente há diferenças genéticas entre as cultivares convencional e transgênica, mesmo essas sendo isogênicas, pois as diferenças encontradas são independentes da ação do herbicida. 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 (NODARI; GUERRA, 2001).

Fixação biológica de nitrogênio, acúmulo e abundância isotópica de ¹⁵N

A biomassa seca de nódulos é uma das principais formas de avaliar a eficiência de fixação biológica de nitrogênio em soja, sendo aceitável um coeficiente de variação (CV%) menor que 33% (SOUZA, 2008; SOUZA et al., 2008; ZOBIOLE, 2010). Neste estudo, o CV para FBN total foi de 17% para as cultivares Valiosa e Conquista (Tabela 2). Considerando as doses de glifosato e a FBN,

TABELA 2. Equações de regressão entre concentração de glifosato na solução nutritiva (μM) e parâmetros relacionados com a fixação de nitrogênio (Y).

Gráficos (Figura 1)	Y	Cultivares	Equação	r ²	CV(%)
D	FBN total (%)	VALIOSA	$Y = 1,09x + 15,63$	0,86*	17
		CONQUISTA	$Y = -0,038x^2 - 1,77x + 42,94$	0,95*	
E	N folhas (mg planta ⁻¹)	VALIOSA	ns		8
		CONQUISTA	$Y = -0,0034x + 0,24$	0,95*	
F	N caule (mg planta ⁻¹)	VALIOSA	ns		12
		CONQUISTA	$Y = -0,00076x + 0,067$	0,68*	
G	Ab. isotópica folhas (% at. ¹⁵ N)	VALIOSA	$Y = -0,018x + 0,3979$	0,64*	4
		CONQUISTA	ns		
H	Ab. isotópica caule (% at. ¹⁵ N)	VALIOSA	$Y = -0,0199x + 4$	0,63*	4
		CONQUISTA	$Y = 0,0105x + 3,549$	0,72*	

F: *significativo a 5% de probabilidade; ns: não significativo. FBN: Fixação biológica de N.

houve correlação negativa na 'Conquista' e correlação positiva na 'Valiosa'.

Na 'Valiosa', o acúmulo de N foi praticamente constante na parte aérea (Figuras 1. E e F). Entretanto, com a diminuição da abundância isotópica de ¹⁵N (Figuras 1. G e H) e o aumento da FBN (Figura 1. D), é muito provável que o glifosato afetou a absorção radicular de N da solução nutritiva (enriquecida em ¹⁵N), uma vez que a forma deste nutriente na solução é a iônica (NO₃⁻) e as plantas possuem maior facilidade de absorver as formas prontamente disponíveis, como o N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺ (MALAVOLTA et al., 1997), em detrimento do N atmosférico fixado simbioticamente.

A FBN da 'Valiosa', medida na maior dose de glifosato em solução nutritiva (32 μM),

não chegou a 50%, valor muito baixo para uma leguminosa como a soja, que chega a retirar mais de 80% do N que necessita por meio desse processo (ALVES et al., 2006; EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2011). O fato pode ser explicado porque a quantidade de N contido na solução nutritiva, que foi constantemente renovada, pode ter sido suficientemente para que a cultura absorvesse preferencialmente o N-NO₃⁻ diretamente da solução.

Na 'Conquista', tanto a matéria seca de raízes quanto de nódulos foram reduzidos como consequência do efeito fitotóxico do herbicida, apresentando efeitos deletérios, tanto na absorção de N da solução quanto do N atmosférico, via FBN (Figura 1. D).

TABELA 3. Equações de regressão entre concentração de glifosato na solução nutritiva (μM) e valores de Índice SPAD (Y).

Gráficos (Figura 1)	Y	Cultivares	Equação	r ²	CV(%)
I	Índice SPAD 3º trifólio	VALIOSA	$Y = 0,008x^2 - 0,21x + 27,19$	0,61*	5,5
		CONQUISTA	$Y = -0,015x^2 + 0,35x + 28,27$	0,98*	

F: *significativo a 5% de probabilidade; ns: não significativo.

Teor de clorofila

Vários trabalhos têm demonstrado que o conteúdo de clorofila medido com o clorofilômetro SPAD, além de não destrutivo, correlaciona-se com a concentração de nitrogênio na planta, onde seu uso tem-se tornado muito popular na última década (UDDLING et al., 2007). A soja RR mostra, constantemente em condições de campo, um sintoma clorótico indesejável atribuído ao acúmulo do primeiro metabólito fitotóxico do glifosato, conhecido como ácido aminometilfosfônico (AMPA), o qual é um dos responsáveis pela diminuição da biomassa seca da parte aérea e raiz e do teor de clorofila (KING et al., 2001). Entretanto, neste trabalho, não foi observado o efeito clorótico na folha da soja transgênica ('Valiosa') por causa, provavelmente, do curto tempo de exposição ao herbicida (20 dias) (Figura 1. I). Também não foram encontradas diferenças no índice SPAD em experimento realizado com a cultivar de soja BRS 242 RR no estádio R1 (46 dias após a semeadura) (ZOBIOLE et al., 2010).

Somente o índice SPAD da 'Conquista' foi significativamente afetado a partir da dose de 16 μM de glifosato (Figura 1. I), o que pode estar relacionado com menor teor de N na folha. Cada molécula de clorofila possui 4 átomos de N, que permite correlacionar o teor deste nutriente na folha e a concentração de clorofila por área foliar (MALAVOLTA et al., 1997).

CONCLUSÕES

A presença de glifosato na solução nutritiva afeta o desenvolvimento da soja cultivar Conquista.

A presença de glifosato na solução nutritiva não afeta o desenvolvimento da soja cultivar Valiosa.

Na cultivar Valiosa, a absorção de N da solução é afetada, embora o acúmulo deste nutriente na planta seja compensado pelo aumento da taxa de FBN.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. B. G. de; MATTA, M. H. R. da; MONTAGNER, E. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 5-9, 2008.

ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 3, p. 449-456, mar. 2006.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; IGNOTO, R. F. Produção de amônia anidra e aquamônia enriquecida em ^{15}N a partir de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 595-603, jul./set. 2002.

BERVALD, C. M. P.; MENDES, C. R.; TIMM, F. C.; MORAES, D. M.; BARROS, A. C. S. A.; PESKE, S. T. Desempenho fisiológico de sementes de soja de cultivares convencional e transgênica submetidas ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 2, jun. 2010.

BÖHM, G. M. B.; ROMBALDI, C. V. Transformação genética e aplicação de glifosato na microbiota do solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança de grãos de soja geneticamente modificada. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 40, n. 1, jan./fev. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Culturas: Soja**. 2011. Brasília, DF, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 15 jul. 2011.

EMBRAPA AGROBIOLOGIA. **Contribuição da FBN para a cultura da soja em áreas de**

- produção do País.** Seropédica, RJ, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/projetos/04200133805.html>>. Acesso em: 18 jul. 2011.
- FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja.** Londrina, PR: Embrapa Soja, 1998. 72 p.
- GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura.** São Paulo: Monsanto do Brasil, 2005. 60 p.
- 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, UK: John Wiley, 1979. p. 167-176.
- HUBER, D. Efeitos do glifosato em doenças de plantas. **Informações Agronômicas,** Piracicaba, SP, n. 119, p. 13-15, mar. 2007.
- JESUS, S. V.; MARENCO, R. A. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta Amazonica,** Manaus, v. 38, n. 4, dez. 2008.
- JOHNSON, C. M.; STOUT, P. R.; BROYER, T. C.; CARTON, A. B. Comparative chlorinerequirements of different plant species. **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 8, n. 4, p. 337-353, maio, 1957.
- 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.
- LICHTENTHALER, H. K. Vegetation Stress: an introduction to the stress concept in plants. **Journal of Plant Physiology,** v. 148, n. 1-2, p. 3-14, 1996.
- MACIEL, M. Safra 80% transgênica. **Diário de Cuiabá,** Cuiabá, 27 abr. 2011. Economia. Disponível em: <<http://www.diariodecuiaba.com.br/detalhe.php?cod=391738>>. Acesso em: 15 jul. 2011.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações.** Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.
- MALTY, J. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 41, n. 2, p. 285-291, 2006.
- MATALLO, M. B.; ALMEIDA, S. D. B.; CERDEIRA, A. L.; FRANCO, D. A. S.; LUCHINI, L. C.; MOURA, M. A. M.; DUKE, S. O. Monitoramento do ácido chiquímico no manejo de plantas daninhas com glifosato em pomar comercial de citros. **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 77, n. 2, p. 355-358, abr./jun., 2010.
- MOORMAN, T. B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. **Weed Science,** v. 34, p. 628-633, 1986.
- NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia,** Brasília, DF, v.18, n.1, p. 91-116, jan./abr. 2001.
- OMETTO, J. C. **Registros e estimativas dos parâmetros meteorológicos da região de Piracicaba, SP.** Piracicaba, SP: Fealq, 1991. 76 p.
- 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**, v. 35, n. 5, p. 1451-1461, 1995.
- PEREIRA, W. A.; GIÚDICE, M. P. del; CARNEIRO, J. E. S.; DIAS, D. C. F. S.; BORÉM, A. Fluxo gênico em soja geneticamente modificada e método para sua detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 7, p. 999-1006, 2007.
- 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, MG, 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, MG, v. 25, n. 1, p. 165-171, jan./mar. 2007.
- SOUZA, R. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CHUEIRE, M. O.; BARCELLOS, F. G.; CAMPO, R. J. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 1, p. 71-82, 2008.
- SOUZA, R. A. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 83-91, 2008.
- TUFFI SANTOS, L. T. D.; TIBURCIO, S. A. R.; SANTOS, B. J.; FERREIRA, A. F.; OLIVEIRA, A. J.; BENTIVENHA, S.; FERREIRA, R. L. Exuadação radicular de glyphosate por Braquiária e seus efeitos em plantas de eucalipto. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. **Trabalhos científicos...** Botucatu, SP: Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, 2007.
- UDDLING, J.; GELANG-ALFREDSSON, J.; PIKI, K.; PLEIJEL, H. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings, **Photosynthesis Research**. v. 91, n. 1, p. 37-46, 2007.
- ZILLI, J. E.; SMIDERLE, O. J.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. População microbiana em solo cultivado com soja e tratado com diferentes herbicidas em área de cerrado no Estado de Roraima. **Acta Amazonica**, Manaus. v. 37, n. 2, p. 201-212, 2007.
- ZOBIOLE, L. H. S; OLIVEIRA JUNIOR., R. S.; CONSTANTIN, J.; BIFFE, D. F.; KREMER, R. J. Uso de aminoácido exógeno na prevenção de injúrias causadas por glyphosate na soja RR. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 28, n. 3, p. 643-653, 2010.