

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

**EFEITOS DO GLYPHOSATE E DO FÓSFORO
EM EUCALIPTO**

Fernanda Campos Mastrotti Pereira
Engenheira Agrônoma

2016

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

**EFEITOS DO GLYPHOSATE E DO FÓSFORO
EM EUCALIPTO**

Fernanda Campos Mastrotti Pereira

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves

Coorientadores: Prof. Dr. Silvano Bianco

Profa. Dra. Wendy Ann Peer

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

2016

P436e Pereira, Fernanda Campos Mastrotti
Efeitos do glyphosate e do fósforo em eucalipto / Fernanda Campos Mastrotti Pereira. -- Jaboticabal, 2016
vi, 183 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Pedro Luis da Costa Aguiar Alves

Banca examinadora: Edivaldo Domingues Velini, Priscila Lupino Gratão, Rinaldo Cesar de Paula, Tiago Pereira Salgado

Bibliografia

1. *Eucalyptus grandis*. 2. Membrana plasmática. 3. Proteínas. 4. Transportadores de fosfato. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.811:634.0.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITOS DO GLYPHOSATE E DO FÓSFORO EM EUCALIPTO

AUTORA: FERNANDA CAMPOS MASTROTTI PEREIRA

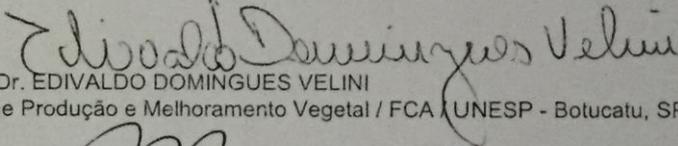
ORIENTADOR: PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES

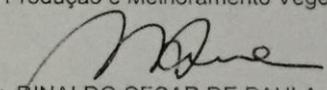
CO-ORIENTADOR: SILVANO BIANCO

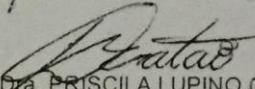
CO-ORIENTADOR: WENDY ANN PEER

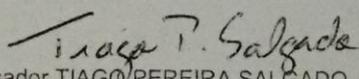
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI
Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / FCAV / UNESP - Botucatu, SP


Prof. Dr. RINALDO CESAR DE PAULA
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisador TIAGO PEREIRA SALGADO
Herbae Consultoria e Projetos Agrícolas Ltda. - Jaboticabal

Jaboticabal, 10 de junho de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FERNANDA CAMPOS MASTROTTI PEREIRA – nascida em São Caetano do Sul, Estado de São Paulo, Brasil, aos 20 de Outubro de 1985. Graduiu-se Engenheira Agrônoma pelo Campus de Registro da Universidade Estadual Paulista (UNESP), no ano de 2009. Obteve o título de Mestre em Agronomia na área de Produção Vegetal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), no ano de 2012. No mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado nessa mesma instituição. Desde 2009, atua em pesquisa na área de Matologia, principalmente em interferência de plantas daninhas, herbicidas, adubação e nutrição da cultura de eucalipto. Nos últimos anos tem participado de eventos científicos nacionais e internacionais na sua área de atuação, bem como da organização de eventos nacionais. A autora também publicou artigos científicos em revistas nacionais e internacionais. Em 2015, esteve em estágio de Doutorado Sandwich na University of Maryland, EUA, onde trabalhou com transportadores de fosfato e glyphosate.

EPÍGRAFE

“O Senhor é meu pastor, nada me faltará”.

Salmo 22

“O que estamos fazendo hoje deve sempre nos aproximar do lugar em que
desejamos estar amanhã”

Provérbio Chinês

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Sueli e Gerson, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a vida todas as manhãs, e a chance de ser sempre melhor.

Aos meus pais Sueli e Gerson, e ao meu irmão Flávio, que sempre me amaram, me apoiaram e acreditaram em mim.

Ao meu orientador Prof. Pedro, pela amizade, compreensão, apoio, incentivo e ensinamentos transmitidos.

Aos Prof. Dr. Silvano Bianco, pela ajuda com as análises de nutrição e pelos ensinamentos.

A Prof^a. Dr^a. Wendy Ann Peer, pela orientação no doutorado sanduíche, por ter me recebido tão bem na UMD, pelas longas tardes esperando pelos protoplastos e por todos os bons momentos.

Ao CNPQ (Projeto 156323/2012-5), FAPESP (Processo nº 2011/201705-3) e a CAPES (Processo nº BEX-9553/14-2) pela concessão das bolsas de estudo para a realização do curso de doutorado e doutorado sanduíche.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, através do Programa de Produção Vegetal, que possibilitou a realização do curso.

A Mariluce Nepomuceno, pela colaboração indispensável nas atividades diárias, na redação da tese e artigos, e principalmente, por todos os ótimos momentos que passamos juntas ao longo desses anos.

A todos os colegas do LAPDA.

Aos membros da banca da defesa, Prof^a. Dr^a. Priscila Lupino Gratão, Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula e Tiago Perera Salgado, pelas discussões, conselhos, incentivos e momentos valiosos.

Aos Prof. Dr. Edivaldo D. Velini, Prof. Dr. Caio Carbonari e ao NUPAN pela realização de parte das análises.

A Carolina Monteiro, Prof^a. Dr^a. Priscila Lupino Gratão e as técnicas de laboratório Sônia Carregari e Eliane Cistina da Cunha Alves, pela ajuda na realização de parte das análises.

A todos aqueles que não foram citados aqui, mas que direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

Sou muito grata a todos vocês!

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	iii
Summary.....	v
Capítulo 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Introdução	1
Revisão de literatura.....	3
A cultura do eucalipto.....	3
O fósforo.....	4
Absorção, translocação e transporte de fosfato	5
A deficiência de fosfato e a expressão gênica de transportadores.....	7
O herbicida glyphosate.....	8
Absorção, translocação e transporte de glyphosate	11
Interações entre transportadores de fosfato e glyphosate.....	12
Hipótese.....	13
Objetivos gerais e específicos	14
Referências.....	14
Capítulo 2 – CINÉTICA DE ABSORÇÃO DE FÓSFORO E EFICIÊNCIA NUTRICIONAL DE MACRONUTRIENTES E BORO EM MUDAS DE EUCALIPTO.....	23
Resumo.....	23
Introdução	24
Material e métodos.....	26
Resultados.....	30
Características de crescimento.....	30
Cinética de absorção de fósforo.....	31
Eficiências nutricionais.....	35
Discussão	36
Conclusões.....	45
Referências.....	45

Capítulo 3 – RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS, METABÓLICAS E NUTRICIONAIS DE CLONES DE EUCALIPTO CULTIVADOS COM CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO E GLYPHOSATE.....	51
Resumo	51
Introdução	53
Material e métodos.....	54
Experimentos I e II – em casa de vegetação.....	54
Experimentos III e IV – em câmara de crescimento.....	59
Resultados	62
Experimento I – em casa de vegetação – clone GG100.....	62
Experimento II – em casa de vegetação – clone I144	74
Experimento III – em câmara de crescimento – clone GG100.....	87
Experimento IV – em câmara de crescimento – clone I144.....	107
Discussão.....	121
Conclusões.....	137
Referências.....	137
Capítulo 4 – EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE FOSFATO E EFEITOS DO FOSFATO NA ABSORÇÃO, TRANSLOCAÇÃO E TRANSPORTE DE ¹⁴C-GLYPHOSATE EM EUCALIPTO.....	148
Resumo.....	148
Introdução.....	150
Material e métodos.....	152
Experimento I - Expressão gênica de transportadores de fosfato.....	152
Experimento II – Absorção e translocação de ¹⁴ C-glyphosate.....	155
Experimento III – Transporte de ¹⁴ C-glyphosate em protoplastos.....	156
Resultados	157
Experimento I - Expressão gênica de transportadores de fosfato.....	157
Experimento II – Absorção e translocação de ¹⁴ C-glyphosate	161
Experimento III – Transporte de ¹⁴ C-glyphosate em protoplastos.....	167
Discussão.....	169
Conclusões.....	176
Referências.....	177

EFEITOS DO GLYPHOSATE E DO FÓSFORO EM EUCALIPTO

RESUMO – A cultura do eucalipto apresenta uma grande importância no cenário econômico nacional e mundial, oferecendo uma vasta gama de produtos florestais. No entanto, a disponibilidade de fósforo nos solos raramente é adequada para o crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas de eucalipto, bem como para diversas outras culturas. A presença de plantas daninhas em eucaliptais é outro fator limitante, e para o manejo da comunidade infestante, glyphosate é o herbicida mais utilizado. As plantas de eucalipto, quando cultivadas em diferentes concentrações de fósforo, podem alterar a expressão gênica de transportadores de fosfato. Em algumas condições, a síntese de transportadores de fosfato de alta afinidade pode ser incrementada. Esses transportadores podem ter afinidade pelo grupo fosfonato do glyphosate, transportando esse herbicida via membrana plasmática. Assim, podem ocorrer alterações no comportamento do glyphosate em função das concentrações de fósforo. Estudos do efeito diferencial de glyphosate em função de concentrações de fósforo e do transporte de glyphosate mediado por transportadores de fosfato ainda são escassos, principalmente em uma espécie perene, como o eucalipto. Com essa pesquisa objetivou-se (1) avaliar, em clones de *Eucalyptus urophylla* (GG100 e I144) a cinética de absorção de fósforo, as eficiências nutricionais de macronutrientes e seus reflexos no crescimento das plantas; (2) verificar as alterações fotossintéticas, metabólicas e nutricionais de clones de *E. urophylla* (GG100 e I144) cultivados em concentrações de fósforo e submetidos à aplicação de glyphosate; e (3) estudar, em *E. grandis*, a coordenação da expressão gênica de transportadores de fosfato, a absorção e a translocação de ^{14}C -glyphosate, e o transporte de ^{14}C -glyphosate através da membrana plasmática em protoplastos. Os experimentos com *E. urophylla* foram realizados na Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, SP, enquanto aqueles com *E. grandis* foram desenvolvidos na University of Maryland, Maryland, EUA. Após a avaliação dos parâmetros cinéticos de absorção de fósforo, o clone I144 foi superior, apresentando menores C_{\min} e K_m (concentração limite abaixo da qual a planta é incapaz de absorver um elemento na solução e concentração do nutriente na solução onde foi atingida metade da V_{\max} , respectivamente) e maior V_{\max} (velocidade máxima de absorção). As eficiências de absorção, translocação e utilização de macronutrientes também foram maiores no clone I144, com exceção da eficiência de utilização de potássio, superior no clone GG100. Não houve diferenças na eficiência nutricional dos clones em relação ao boro. Para a avaliação das alterações fotossintéticas, metabólicas e nutricionais ocasionadas por glyphosate em função de concentrações de fósforo, experimentos foram conduzidos em casa de vegetação utilizando areia como substrato (pulverização foliar de glyphosate) e em câmara de crescimento utilizando sistema hidropônico (aplicação radicular de glyphosate). Para ambos os experimentos, os nutrientes foram oferecidos por meio da solução nutritiva, que foi ajustada para as doses de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X de fósforo (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada para o preparo da solução nutritiva). Interações entre as concentrações de fósforo e as doses de glyphosate ocorreram nas características que avaliaram o processo fotossintético (teores de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II), nos teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico, nos teores nutricionais e massas secas.

Essas características ou teores foram menores ou mais intensamente reduzidos, após glyphosate, nas plantas cultivadas com menores concentrações de fósforo (0,5X e, em alguns casos, 1X). Por fim, experimentos foram conduzidos em *E. grandis*, e a expressão gênica dos transportadores de fosfato (mensurada por meio de RT-qPCR) nas folhas e nas raízes dessas plantas foram alteradas em resposta a deficiência de fosfato. A expressão de transportadores de alta afinidade foi incrementada pela deficiência de fosfato. A absorção de ¹⁴C-glyphosate aplicado via foliar ou radicular foi maior nas plantas submetidas à deficiência de fosfato, e a translocação deste herbicida também foi mais rápida nessas plantas. Nos protoplastos, o transporte de ¹⁴C-glyphosate via membrana plasmática ocorreu rapidamente na ausência de fosfato, e de modo mais lento quando NaH₂PO₄ foi adicionado ao meio. Possivelmente, o transporte de fosfato através da membrana plasmática foi realizado em um primeiro momento, e com a redução do fosfato disponível no meio, o transporte de glyphosate foi iniciado, provavelmente, por transportadores de fosfato de alta afinidade.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*, membrana plasmática, proteínas, transportadores de fosfato

EFFECTS OF GLYPHOSATE AND PHOSPHOROUS IN EUCALYPT

ABSTRACT – Eucalypt plantation have great importance in the national and global economic environment, offering a wide range of forest products. However, the phosphorus availability in soils is rarely appropriate for growth, development and yield of eucalypt plants, as well as several other crops. The presence of weeds in eucalypt plantations is another limiting factor, and for weed management glyphosate is the most used herbicide. Eucalypt plants grown under different phosphorus concentrations can change phosphate transporters gene expression. Under specific conditions, high-affinity phosphate transporter synthesis can be increased. Such transporters can have affinity for glyphosate phosphonate group, transporting this herbicide through plasma membrane. So, changes may occur in glyphosate behavior depending on phosphorus concentrations. Studies of glyphosate effect as a function of phosphorus concentrations and glyphosate transport mediated by phosphate transporters are still scarce, especially in a perennial species, such as eucalypt. This study aimed (1) to evaluate, in *Eucalyptus urophylla* clones (GG100 and I144), the phosphorus absorption kinetics, the nutritional efficiency of macronutrients and their effects on plant growth; (2) verify the photosynthetic, nutritional and metabolic changes in *E. urophylla* clones (GG100 and I144) grown under phosphorus concentrations and submitted to glyphosate application; and (3) study in *E. grandis* the phosphate transporters gene expression coordination, the ^{14}C -glyphosate uptake and translocation, and the ^{14}C -glyphosate transport through the plasma membrane in protoplasts. The experiments with *E. urophylla* were carried out at São Paulo State University, Campus of Jaboticabal, SP, while the experiment with *E. grandis* were developed at University of Maryland, Maryland, USA. After the evaluation of phosphorus absorption kinetic parameters, I144 clone was considered superior, presenting lower C_{\min} and K_m (respectively, the limiting concentration for absorbing an element in solution and the nutrient concentration in solution which was reached half of V_{\max} ,) and higher V_{\max} (maximum rate of absorption). The efficiency of absorption, translocation and utilization of macronutrients were also higher in I144 clone, with the exception of potassium utilization efficiency, higher in GG100 clone. No differences in boron nutritional efficiency were found. For the evaluation of photosynthetic, nutritional and metabolic changes caused by glyphosate according phosphorus concentrations, experiments were performed in a greenhouse using sand (glyphosate sprayed in leaves) and in a growth chamber using hydroponic system (glyphosate applied in roots). For both experiments, nutrients were provided by nutrient solution, which was adjusted to phosphorus levels 0.5X, 1X and 1.5X (where X corresponded to the phosphorus concentration recommended for nutrient solution preparation). Interactions between phosphorus concentration and glyphosate doses occurred in the characteristics that evaluated the photosynthetic process (chlorophyll content and quantum efficiency of photosystem II), in the glyphosate, AMPA and shikimic acid content, and in the nutritional content and dry mass. These characteristics or contents were smaller or more strongly reduced after glyphosate in plants grown with lower phosphorus concentration (0.5X, and in some cases, 1X). Finally, experiments were conducted in *E. grandis*, and the gene expression of phosphate transporters (measured by RT-qPCR) in leaves and roots of these plants have been modified as a phosphate deficiency response. High-affinity transporters

expression was increased by phosphate deficiency. The absorption of ^{14}C -glyphosate applied in leaves or roots was higher in plants subjected to phosphate deficiency, and glyphosate translocation was also faster in these plants. In protoplasts, ^{14}C -glyphosate transport via plasma membrane was fast in phosphate absence and slower when NaH_2PO_4 was added to the medium. Possibly, the phosphate transport through the plasma membrane was performed initially, and with the phosphate reduction in the medium, the glyphosate transport was started probably for high-affinity phosphate transporters.

Key-words: *Eucalyptus grandis*, cell membrane, proteins, phosphate transporters

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

INTRODUÇÃO

Atualmente, a cultura do eucalipto apresenta uma grande importância no cenário econômico nacional e mundial. No Brasil, as florestas plantadas com eucalipto apresentam incrementos anuais na área plantada e em sua produtividade, e tem grande participação no PIB nacional, oferecendo uma vasta gama de produtos florestais como celulose, energia, carvão, aglomerados, serraria, dentre outros (IBÁ, 2015).

O fósforo é o segundo macronutriente mais limitante ao crescimento das plantas. Este nutriente tem um papel importantíssimo na fotossíntese, e é um elemento chave de várias vias metabólicas e reações bioquímicas (VERSAW; HARRISON, 2002). A disponibilidade desse nutriente na maioria dos solos, no Brasil e no mundo, raramente é adequada para o crescimento e desenvolvimento ideal das plantas (ABEL et al., 2002). A forma assimilável de fósforo pelas plantas é o ânion ortofosfato, extremamente insolúvel na maioria dos solos, já que interage rapidamente com cátions (HIRSCH et al., 2006) e compostos orgânicos (LÓPEZ-BUCIO et al., 2000).

Assim, as plantas desenvolveram estratégias para aumentar a aquisição, a translocação e a utilização do fosfato quando se encontram em condições limitantes (RAGHOTHAMA, 1999). Uma delas é a expressão gênica de transportadores de fosfato em função da disponibilidade desse elemento (induzindo a expressão de transportadores de baixa e alta afinidade por fosfato) (DARAM, 1998; GUO et al., 2007; BAYLE et al., 2011).

O glyphosate é um dos herbicidas mais utilizados no mundo, pois é recomendado para o controle de várias espécies vegetais anuais e perenes; possui rápida ligação às partículas do solo, rápida biodegradação e baixa toxicidade a mamíferos, aves e peixes (AHSAN et al., 2008; PRESTON; WAKELIN, 2008).

Devido ao seu amplo espectro de ação, a ocorrência de deriva de glyphosate também pode acarretar em alterações nas plantas não alvo. O glyphosate atua diretamente na rota do chiquimato, inibindo a síntese de aminoácidos aromáticos

essenciais precursores de outros produtos, como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos (TAN et al., 2006; REDDY et al., 2008), indispensáveis para a síntese de proteínas e o crescimento das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, o efeito mais rápido e drástico da aplicação de glyphosate em plantas sensíveis é o acúmulo de ácido chiquímico (LYDON; DUKE, 1988). O glyphosate pode ainda afetar diretamente a fotossíntese (AHSAN et al., 2008), interferindo na organização do aparelho fotossintético (MARÍA et al., 2005; AHSAN et al., 2008). A deriva acidental de glyphosate em plantas não alvo ainda pode promover sintomas de fitointoxicação, como branqueamento e/ou clorose e redução do crescimento das plantas (FUCHS et al., 2002; NELSON, 2008, TUFFI SANTOS et al., 2015).

Na literatura podem ser encontradas uma série de pesquisas que relacionam o transporte de glyphosate aos transportadores de fosfato. Essas pesquisas sugerem que o glyphosate, em condições de deficiência de fosfato, pode ser transportado por transportadores de fosfato, uma vez que esse herbicida tem em sua molécula um grupo fosfonato.

No entanto, os mecanismos de absorção, translocação e transporte de fósforo e glyphosate ainda não são totalmente conhecidos. E os estudos da interação entre fósforo e glyphosate por meio dos transportadores de fosfato ainda são escassos, principalmente em espécies perenes, como o eucalipto.

Deste modo, o objetivo geral foi verificar os efeitos do glyphosate nas características fotossintéticas, no perfil metabólico e na nutrição de clones de eucalipto, bem como a expressão gênica de transportadores de fosfato e a absorção, translocação e transporte de glyphosate em concentrações de fósforo.

REVISÃO DE LITERATURA

A cultura do eucalipto

O gênero *Eucalyptus* conta com cerca de 800 espécies (COPPEN, 2005), e é caracterizado por possuir uma grande plasticidade e uma ampla dispersão mundial, embora a maioria das espécies de eucalipto tenha como centro de origem a Austrália. Esse gênero tem como uma das principais características o crescimento satisfatório em diversas condições edafoclimáticas.

Existem divergências quanto à data de introdução do eucalipto no Brasil. Contudo, a utilização de produtos oriundos de florestas plantadas aumentou significativamente a partir da década de 60, com a criação de uma política governamental de incentivos fiscais. Desde então, a grande demanda pelos produtos florestais tem impulsionado um planejamento mais criterioso nas diversas etapas do processo de produção (MELLO et al., 2005).

No Brasil, a cultura do eucalipto está em constante expansão territorial e anualmente tem sua produtividade média ponderada incrementada, se destacando como a principal espécie fornecedora de madeira e celulose nos mercados nacional e internacional. É importante salientar que o eucalipto é cultivado para os mais diversos fins, incluindo celulose, energia, lenha, carvão, aglomerados, serraria, óleos para indústrias farmacêuticas, mel, ornamentação, quebra-vento, dentre outros.

O uso cada vez mais intenso de alta tecnologia, e os grandes investimentos em pesquisas (SANTOS et al., 2005), que vão desde a produção dos materiais comerciais que originarão as mudas, até a colheita, tem permitido ao Brasil se destacar na produção dos produtos florestais.

De acordo com a Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ), 5,56 milhões de hectares são atualmente cultivados com eucalipto no Brasil. A maior concentração de áreas plantadas ocorre nas regiões Sul e Sudeste do País, onde também estão localizadas as principais unidades industriais dos segmentos de celulose, papel e painéis de madeira industrializada (IBÁ, 2015).

Quando comparada a outros países, a área florestal brasileira pode parecer pequena, contudo, devido ao fato de o Brasil possuir uma das maiores produtividades

do mundo, o País foi responsável por 17,5% de toda a madeira produzida no ano de 2014 (IBÁ, 2015).

As elevadas produtividades das florestas brasileiras podem ser atribuídas ao melhoramento genético, que desenvolveu clones adaptados a diferentes condições e tolerantes/resistentes a doenças e pragas; e a adoção de boas técnicas de manejo florestal, como um alto investimento em adubações e no controle fitossanitário, permitindo que o eucalipto expresse em campo todo o seu potencial genético para produção de madeira, energia ou outros produtos florestais. A produtividade média ponderada dos plantios de eucalipto, em função da área plantada em 2014, foi de 39 m³ ha⁻¹ ano⁻¹ (IBÁ, 2015).

O gênero *Eucalyptus* compreende plantas de crescimento inicial rápido. Contudo, cuidados devem ser tomados para garantir o bom desenvolvimento das plantas e uma elevada produtividade no final de seu ciclo. Dentre esses cuidados, a adubação para suprir a demanda nutricional das plantas é essencial, principalmente a adubação fosfatada, uma vez que muitos solos brasileiros e em todo o mundo são nutricionalmente pobres em fósforo (ao menos em fosfato, forma preferencialmente absorvida pelas plantas). Outro cuidado fundamental é o manejo das plantas daninhas, e nesse contexto o herbicida glyphosate é muito utilizado.

O fósforo

O fósforo é um dos nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, uma vez que é o componente central de processos metabólicos fundamentais para os vegetais, como a fotossíntese e a respiração. Esse elemento ainda possui distintas funções em diversos processos biológicos, como síntese de ácidos nucleicos, síntese e estabilidade da membrana, ativação e inativação de enzimas, reações de redox, sinalização, metabolismo de carboidratos e fixação de nitrogênio (RAGHOTHAMA, 1999).

No metabolismo celular, existem vários compostos intermediários que contêm fósforo em sua constituição, como ATP e pirofosfato, que transferem energia de processos energéticos (como a fotofosforilação, fosforilação oxidativa e a fosforilação de substratos) para processos dependentes de energia (como a

biossíntese de compostos e bombeamento de íons) (PREISS, 1984; WALKER; SIVAK, 1986).

Desta forma, o fósforo é um elemento essencial para a produção agrícola. Contudo, o esse elemento apresenta baixa mobilidade no solo, sendo um dos nutrientes limitante ao crescimento e desenvolvimento das plantas (NOVAIS; SMYTH, 1999), principalmente em regiões tropicais e semi-áridas (MALAVOLTA, 1997). No Brasil, o fósforo é um dos nutrientes que mais limita a produção florestal, em razão de seus teores naturalmente baixos nos solos e de sua elevada capacidade em interagir com os colóides presentes abundantemente em alguns tipos de solo (BARROS; NOVAIS, 1996).

Embora a quantidade total de fósforo no solo seja relativamente abundante, boa parte desse elemento encontra-se indisponível para absorção. Menos de 0,1% do total desse elemento encontra-se na solução do solo, fato associado ao material de origem, grau de intemperismo, teor de matéria orgânica e da reação do solo (FASSBANDER, 1986). Estudos indicaram que apenas 20% do fósforo aplicado no solo pode ser prontamente absorvido pelo sistema radicular das plantas, e os 80% restantes se tornam rapidamente indisponíveis - imobilizado, adsorvido e/ou transformado em uma forma orgânica (ALMEIDA, 2002). A recuperação do fósforo durante o ciclo de produção também é bastante limitada.

As áreas de reflorestamento no Brasil têm se expandido para solos predominantemente arenosos, carentes nutricionalmente, com acidez elevada e altos teores de alumínio. Grande parte dos solos mundiais também apresenta alguma limitação quanto a disponibilidade de fósforo (BARBER et al., 1963). Assim, a oferta de fósforo visando suprir as necessidades das plantas é essencial para a boa produtividade agrícola e florestal, e estudos de mecanismos que incrementem a absorção do fósforo devem ser incentivados.

Absorção, translocação e transporte de fosfato

De um modo geral, o fósforo é absorvido no solo preferencialmente na forma de ânion ortofosfato (H_2PO_4^- e HPO_4^{2-}). A disponibilidade de fósforo no solo é controlada pela força iônica, pH baixo, concentração de fósforo e metais (ferro,

alumínio e cálcio) e ânions competitivos e/ou ácidos orgânicos (HINSINGER, 2001). A disponibilidade desse elemento também pode ser alterada pela dissolução/precipitação de minerais carreadores de fósforo, adsorção/desadsorção do fosfato das superfícies do solo e a hidrólise da matéria orgânica (HINSINGER, 2001).

Em virtude de sua capacidade reativa com os componentes do solo, o transporte desse elemento para as plantas ocorre preferencialmente via difusão (HORST et al., 2001). Na superfície radicular o fosfato é facilmente adquirido, uma vez que é formada uma zona de depressão de fosfato de 0,2 a 1,0 mm em torno do sistema radicular (HOLFORD, 1997).

Estudos da cinética de absorção de fosfato utilizando inibidores demonstraram que o transporte ativo foi necessário para que as plantas superassem a diferença de concentração entre o teor de fosfato na solução do solo (μM), no simplasto (mM) e o potencial negativo de membrana (RAGHOTHAMA, 1999). Assim, a absorção de fosfato ocorre por meio de um processo de co-transporte que envolve prótons (H^+) via gradiente eletroquímico de membrana com consumo de ATP (SAKANO, 1990). A reposição de fósforo na planta promove a despolarização da membrana plasmática e acidificação do citosol. A repolarização da membrana plasmática é realizada pela H^+ - ATPase, que bombeia prótons para o meio externo, mantendo o pH interno celular e gerando a força motriz para absorção deste elemento pelas raízes (ULLRICH; NOVACKY, 1990; SCHACHTMAN et al., 1998).

O fosfato é móvel na planta, podendo ser translocado tanto para a parte aérea quanto para a raiz. Após a absorção do fosfato pelas raízes, esse nutriente é transportado através da membrana plasmática de células epidérmicas e corticais por meio de um conjunto de transportadores de fosfato (POIRIER; BUCHER, 2002). Na literatura foram descritos dois sistemas de transporte de fosfato, sendo um de alta afinidade, ativado em condições de baixa disponibilidade de fósforo inorgânico, e outro de baixa afinidade, expresso constitutivamente (RAGHOTHAMA, 1999).

Contudo, conhecimentos sobre os mecanismos de translocação e transporte de fosfato nas plantas ainda não foram completamente esclarecidos.

A deficiência de fósforo e a expressão gênica de transportadores

As plantas desenvolveram diversas estratégias para aquisição e uso do fósforo em ambientes de baixa disponibilidade desse nutriente: 1- incremento na produção e secreção de fosfatases e exsudação de ácidos orgânicos para aumentar a disponibilidade de fósforo no solo; 2- maior crescimento das raízes combinado com modificações na arquitetura radicular, expansão das superfícies de absorção pela proliferação de pêlos radiculares; 3- mobilização, alocação e realocação do fósforo interno; 4- modificações no metabolismo de carbono ativando reações que não requerem grande quantidade de fósforo e vias alternativas da respiração; e 5- expressão de transportadores de fósforo (SCHACHTMAN, 1998; PLAXTON; CARSWELL, 1999; RAGHOTHAMA, 1999; VANCE et al., 2003; UHDE-STONE et al., 2003).

Os transportadores de fósforo são responsáveis pela aquisição de fósforo através da membrana plasmática, pelo transporte de fósforo para cloroplastos, mitocôndrias, complexo de Golgi e pela redistribuição de fósforo por toda a planta (MUDGE et al., 2002; POIRIER; BUCHER, 2002; VERSAW; HARRISON, 2002; RAGHOTHAMA; KARTHIKEYAN, 2005; GUO et al., 2008; CUBERO et al., 2009; dentre outros).

Em condições de deficiência de fósforo, algumas espécies alteraram a expressão gênica dos transportadores de fósforo, acarretando no aumento da expressão de transportadores de alta afinidade (esse grupo de transportadores é capaz de se ligar e transportar diversas formas de fósforo, e inclusive moléculas que contenham entre seus componentes fósforo) capazes de aumentar o influxo de fósforo várias vezes (LEE, 1993), e assim, garantir o suprimento desse nutriente necessário a seu metabolismo e crescimento (BAYLE et al., 2011). Segundo Raghothama (1999), a ativação de genes específicos durante a deficiência de fósforo parece ser um fenômeno universal; e o acúmulo diferencial de proteínas nessa situação é um indicativo de grandes alterações na expressão gênica de transportadores de fósforo (DUMONT; LOPES; KREMER, 1990; CARSWELL; GRANT; PLAXTON, 1997; USUDA; SHIMOGAWARA, 1997).

Alguns transportadores de fosfato de alta afinidade já foram clonados e caracterizados, e são constituídos por proteínas integrais de membrana (HENDERSON, 1993). Os primeiros genes codificadores das proteínas foram isolados a partir dos fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* e *Glomus versiforme* (RAGHOTHAMA, 1999).

Estudos realizados em tomateiro comprovaram que a transcrição de genes transportadores de fosfato de alta afinidade (neste caso, LePT1 e LePT2) foi altamente induzida sob condições de deficiência de fosfato (DARAM, 1998). Atualmente, grande parte dos estudos que avaliaram a expressão gênica desses transportadores foi realizada em *Arabidopsis thaliana*. Nessa espécie, nove transportadores de alta afinidade foram identificados, e estes foram fortemente induzidos dentro das primeiras 12 horas de privação de fosfato (MISSION et al., 2005).

Em eucalipto, uma cultura muito cultivada em solos deficientes em fósforo, ainda são escassas pesquisas que estudem a expressão gênica de transportadores de fosfato diante da deficiência desse nutriente.

O herbicida glyphosate

As plantas daninhas competem com as culturas por água, luz, espaço e nutriente, ocasionando a redução do crescimento, da produtividade e depreciação da qualidade do produto final (VIEIRA; SOCOLOWSKI; TAKAKI, 2007). Para reduzir esses prejuízos, faz-se necessária a adoção de métodos de manejo da comunidade infestante.

Como já exposto anteriormente, o Brasil dispõe de vastas áreas cultivadas com eucalipto, inviabilizando métodos de controle que necessitem de muita mão-de-obra, ou que tenham grande dependência de condições climáticas para serem realizados. Dessa forma, o controle químico das plantas daninhas é o mais utilizado atualmente.

O glyphosate é o herbicida mais utilizado mundialmente, e seu amplo uso é devido um conjunto de características favoráveis ao controle das plantas daninhas: possui amplo espectro de ação, sendo utilizado tanto no controle de plantas

daninhas anuais como perenes; tem custo relativamente baixo; baixa toxicidade ao homem e rápida degradação no ambiente (MOREIRA; CHRISTOFFOLETI, 2008; DILL; CAJACOB; PADGETTE, 2008).

O herbicida glyphosate atua na inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, E.C. 2.5.1.19). Esta enzima está presente na rota do ácido chiquímico, que é precursora dos aminoácidos aromáticos essenciais, fenilalanina, tirosina e triptofano e compostos secundários (MAEDA; DUDAREVA, 2012).

A enzima EPSPs catalisa a reação entre chiquimato-3-fosfato (S3P) e fosfoenolpiruvato (PEP), formando 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e fósforo inorgânico (MOLDES et al., 2008; CEDERGREEN; OLESEN, 2010). Essa reação ocorre em duas etapas, iniciando-se pela ligação da enzima EPSPs ao S3P, formando o complexo EPSPs-S3P. Em seguida, o PEP liga-se a este complexo, permitindo o prosseguimento da reação, que é finalizada com a produção de EPSP (TAN et al., 2006).

Após a exposição das plantas a herbicidas que contenham esse ingrediente ativo, o glyphosate não irá se ligar à enzima EPSPs livre, mas sim ao complexo EPSPs-S3P, impedindo a sua interação com PEP, ao formar o complexo inativo EPSPs-S3P-glyphosate. Estudos verificaram que o glyphosate não se liga ao sítio ativo da EPSPs, mas sim a um possível sítio alostérico, resultando em uma mudança conformacional do sítio ativo, dificultando a ligação de PEP.

A EPSPs é a sexta enzima da rota do ácido chiquímico, essencial para a biossíntese de aminoácidos aromáticos em bactérias, algas, fungos e plantas superiores. A rota do ácido chiquímico compreende sete reações catalisadas por seis enzimas (TZIN; GALILI, 2010). Primeiramente, a enzima 3-deoxy-d-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS; EC 2.5.1.54) catalisa a formação de 3-deoxy-d-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) pela condensação de fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose 4-fosfato (TZIN; GALILI, 2010). Essa enzima requer a presença de manganês (Mn^{2+}) e tioredoxin (TRX) reduzido para sua atividade, ligando assim o fluxo de carbono na via do ácido chiquímico ao fluxo de elétrons do fotossistema I (ENTUS; POLING; HERRMANN, 2002).

O próximo passo da rota é a conversão de 3-deoxy-d-arabino-heptulosonato-7-fosfato em 3-desidroquinato (DHQ) pela enzima 3-dehydroquinase sintase

(DHQS; EC 4.2.3.4). O terceiro e quarto passos enzimáticos são catalizados pela enzima bi-funcionais 3-dehydroquinato desidratase (DHQ; EC 4.2.1.10), responsável pela desidratação do DHQ a 3-desidrochiquimato (DHS), seguido pela redução de DHS chiquimato, catalisada pela chiquimato-desidrogenase (SDH; EC 1.1.1.25) (TZIN; GALILI, 2010). Essas enzimas desempenham importante papel na regulação de metabólitos nos pontos de ramificação da rota para garantir a produção suficiente do composto desejado, e são encontradas no ponto de ramificação para a síntese de ácido quínico (DING et al., 2007).

Na quinta reação enzimática, a enzima chiquimato quinase catalisa a fosforilação de chiquimato para produzir chiquimato-3-fosfato (S3P) (TZIN; GALILI, 2010). Posteriormente, a enzima 5-enolpiruvilchiquimato 3- fosfato sintase (EPSPs) cataliza o penúltimo passo da rota do ácido chiquímico, a formação de 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato (EPSP) pela transferência da porção enolpiruvil da PEP para a posição 5- hidroxil do S3P (MAEDA; DUDAREVA, 2012).

O último passo da rota é a conversão de EPSP a corismato pela enzima corismato sintase (CS; EC 4.2.3.5). O corismato é o metabólito central, precursor na síntese dos três aminoácidos aromáticos e outros metabólitos como, o tetrahydrofolato (vitamina B9) (BASSET et al., 2004; WALLER et al., 2010), isochorismato 3 para a produção de ácido salicílico (WILDERMUTH et al., 2001; GARCION et al., 2008), filoquinona (vitamina K1) e pigmentos (GROSS et al., 2006; KIM et al., 2008).

Diante do exposto, a inibição dessa enzima prejudica a produção dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. Diversos estudos mostram que plantas onde glyphosate foi aplicado tornam-se deficientes destes aminoácidos, e a adição exógena desses reverteu os sintomas de intoxicação (FUCHS et al., 2002; AHSAN et al., 2008; MOLDES et al., 2008; REDDY et al., 2008). Além da redução da quantidade de aminoácidos aromáticos, a quantidade de ácido chiquímico e de ácidos benzóicos derivados deste ácido é aumentada. Esses compostos são potencialmente tóxicos às células vegetais (PEREZ-JONES et al., 2007; MATALLO et al., 2009; CEDERGREEN; OLESEN, 2010; ORCARAY et al., 2010).

O glyphosate pode ainda afetar diretamente a fotossíntese, reduzindo a atividade da ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e do ácido

3-fosfoglicérico (AHSAN et al., 2008), e interferindo na organização do aparelho fotossintético (MARÍA et al., 2005; AHSAN et al., 2008). Nas folhas expostas ao glyphosate também puderam ser observados aumentos do nível de peroxidação lipídica, no conteúdo de glutathione, no conteúdo de prolina livre e no fluxo iônico, conectando a ação do glyphosate ao estresse oxidativo das plantas (MOLDES et al., 2008).

Fuchs et al. (2002) destacam ainda o branqueamento, a clorose e a redução do crescimento, concentrados principalmente em tecidos metabolicamente ativos, tais como folhas imaturas, brotamentos, botões florais e raízes.

Os efeitos secundários causados por glyphosate são dependentes de inúmeros fatores, tais como espécie, dose aplicada e estágio da planta (EKER et al., 2006; AHSAN et al., 2008). Entre esses efeitos, podem ser citados a alteração de compostos celulares como auxinas, ligninas, flavonóides, antocianinas e quinonas.

A causa da morte das plantas pela inibição da rota do ácido chiquímico ainda não foi totalmente esclarecida (DUKE; POWLES, 2008). Alguns pesquisadores afirmam que a inibição de síntese de aminoácidos aromáticos é o principal fator responsável pela morte das plantas. No entanto, outros acreditam que o aumento no fluxo de carbono para a rota do ácido chiquímico devido sua desregulação é a principal responsável pela morte das plantas, uma vez que grande parte do carbono utilizado em outras rotas metabólicas essenciais a planta é desviado (FUCHS et al., 2002). Segundo Duke e Powles (2008) esta última explicação é a teoria mais aceitável.

Absorção, translocação e transporte de glyphosate

A eficácia da absorção de um herbicida depende de processos como a retenção da molécula na superfície foliar/radicular, a penetração, a translocação no interior da planta até o sítio de ação e a ação sobre esse sítio. A eficiência do glyphosate é favorecida pela sua rápida distribuição no interior das plantas (GOTTRUP et al., 1976; JACHETTA et al., 1986). Após a aplicação, a absorção do glyphosate envolve uma rápida penetração inicial através da cutícula, seguida por uma fase de absorção mais lenta. A difusão pode ser considerada o principal

processo de transporte do glyphosate através da cutícula, onde diferenças no gradiente de concentração entre a região de deposição do herbicida - na superfície da folha - e o interior da planta podem influenciar o processo de absorção (GRAVENA, 2006).

Uma vez no interior da planta, o transporte de glyphosate segue o padrão fonte-dreno, sugerindo que a translocação pelo floema tenha papel fundamental. No entanto, a translocação do glyphosate através do xilema também foi observada, embora em menor intensidade (PRESTON; WAKELIN, 2008). Assim, o glyphosate pode ser considerado um herbicida de translocação múltipla.

Alguns pesquisadores estudaram a possibilidade da existência de um mecanismo simples e passivo não facilitado para o transporte do glyphosate, já que sua absorção é bastante dependente de sua concentração (GOUGLER; GEISER, 1981; HONEGGER et al., 1986). O movimento do glyphosate no simplasto ocorre através das intercomunicações do protoplasma do parênquima e do floema, e é, portanto, depende da habilidade do herbicida em penetrar na membrana plasmática.

Ainda há escassez de estudos sobre o mecanismo de transporte do glyphosate (absorção através da membrana celular). No entanto, alguns autores relacionaram a participação de transportadores de fosfato a esse processo (BRECKE; DUKE, 1980; DENIS; DELROT, 1993; MORIN et al., 1997; GODOY, 2007). Esses transportadores teriam afinidade com o grupo fosfonato do glyphosate, “auxiliando” sua passagem pela membrana celular.

Interações entre transportadores de fosfato e glyphosate

Na literatura, algumas pesquisas correlacionam o transporte de fosfato e glyphosate. Possivelmente, transportadores de fosfato de alta afinidade estariam ligados a essa hipótese. Contudo, esses mecanismos ainda não são totalmente compreendidos.

Estudos da cinética de absorção do glyphosate indicam que o transporte de seu componente saturável pode ser competitivamente inibido na presença de fosfato ou ácido fosfonofórmico (HETHERINGTON et al., 1998; DENIS & DELROT, 1993). Já em outros experimentos concluiu-se que o fosfato inibiu a absorção de glyphosate

pela bactéria *Arthrobacter*, que tem capacidade de metabolizar esse herbicida (PIPKE, 1987). Outros estudos ainda indicam que o glyphosate inibiu a absorção de fosfato em células isoladas de feijão (BRECKE; DUKE, 1980). Em ambos os casos, glyphosate e fosfato possivelmente competiram pelo mesmo transportador.

Estudos comprovaram que nas espécies *Convolvulus arvensis* (HONEGGER et al., 1986), *Beta vulgaris* (GOUGLER; GEIGER, 1981) e *Vicia faba* (IBAOUÏ et al., 1986) o glyphosate foi transportado para dentro das células por transporte passivo. Entretanto, Denis e Delrot (1993) concluíram que em *V. faba* o glyphosate pode ser conduzido via membrana plasmática por um transportador de fosfato.

Em experimento com *Catharanthus roseus*, Morin et al. (1997) verificaram que o glyphosate foi transportado através das células por transportadores de fosfato da membrana plasmática quando em concentrações de até 100 μM . O glyphosate foi transportado contra um gradiente de concentração, até 18h após as células serem transferidas para o meio com o herbicida. O papel desempenhado por um transportador de fosfato foi demonstrado nesse processo pela existência de um período lag e pela inibição da absorção de glyphosate na presença de altas concentrações de fosfato de sódio. Os pesquisadores ainda utilizaram inibidores de enzimas transportadoras de prótons, que também inibiram o transporte de glyphosate, indicando a possibilidade de um co-transportador com H^+ ao longo de um gradiente de potencial gerado pela H^+ - ATPase (MORIN et al., 1997).

A aplicação de glyphosate em plantas de soja levou a indução de genes transportadores de fósforo de alta afinidade, promovendo aumento na translocação do fósforo dentro da planta (GODOY, 2007). Esse dado corrobora os experimentos citados anteriormente, que comprovam que o sistema transportador de fósforo é também responsável pelo transporte de glyphosate.

HIPÓTESE

Em virtude do relatado, as plantas de eucalipto, quando cultivadas em diferentes concentrações de fósforo, podem alterar a expressão gênica de transportadores de fosfato. Em algumas condições, a síntese de transportadores de fosfato de alta afinidade pode ser incrementada. Esses transportadores, por sua vez,

podem ter afinidade pelo grupo fosfonato presente na molécula do glyphosate, transportando esse herbicida via membrana plasmática. Assim, podem ocorrer alterações no comportamento do glyphosate em função das concentrações de fósforo.

OBJETIVO GERAL

Objetivou-se verificar os efeitos do glyphosate nas características fotossintéticas, no perfil metabólico e na nutrição de clones de eucalipto, bem como a expressão gênica de transportadores de fosfato e a absorção, translocação e transporte de glyphosate em concentrações de fósforo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar, em mudas de clones de *Eucalyptus urophylla* cultivadas em solução nutritiva, a cinética de absorção de fósforo e as eficiências de absorção, translocação e utilização de macronutrientes e boro e seus reflexos no crescimento das plantas.

2. Verificar as alterações fotossintéticas, metabólicas e nutricionais de clones de *Eucalyptus urophylla* cultivados em concentrações de fósforo e submetidas à aplicação de glyphosate.

3. Estudar, em *Eucalyptus grandis*, a coordenação da expressão gênica de transportadores de fosfato, a absorção e a translocação de ^{14}C -glyphosate aplicado via foliar e radicular, e a absorção de ^{14}C -glyphosate através da membrana plasmática em protoplastos, sempre na presença e ausência de fosfato.

REFERÊNCIAS

ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A. Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum*, v. 115, n. 1, p. 1–8, 2002.

AHSAN, N.; LEE, D.; LEE, K. W.; ALAM, I.; LEE, S. H.; BAHK, J. D.; LEE, B. H. Glyphosate induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 1062-1070, 2008.

ALMEIDA, R. S. **Identificação e caracterização de genes de transportadores de fosfato em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2002. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BARBER, S. A.; WALKER, J. M.; VASEY, E. H. Mechanisms for movement of plant nutrients from soil and fertilizer to plant root. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 204–207, 1963.

BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F. Eucalypt nutrition and fertilizer regimes in Brazil. In: ATTIWILL, P.M.; ADAMS, M.A. (Eds.). **Nutrition of *Eucalyptus***. Collingwood: CSIRO, 1996. p.335-355.

BASSET, G. J. C.; QUINLIVAN, E. P.; RAVANEL, S.; RÉBEILLÉ, F.; NICHOLS, B. P.; SHINOZAKI, K.; SEKI, M.; ADAMS-PHILLIPS, L. C.; GIOVANNONI, J. J.; GREGORY, J. F.; HANSON, A. D. Folate synthesis in plants: the p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA–PabB protein that is targeted to plastids. **Proceedings National Academy of Sciences**, v. 101, n. 6, p. 1496– 1501, 2004.

BAYLE, V.; ARRIGHI, F.; CREFF, A.; NESPOULOUS, C.; VIALARE, J. ROSSIGNOL, M.; GONZALEZ, E.; PAZ-ARES, J.; NUSSAUMEA, L. *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. **The Plant Cell**, v. 23, p. 1523–1535, 2011.

BRECKE, B. J.; DUKE, W. B. Effect of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. **Plant Physiology**, v. 66, p. 656-659, 1980.

CARSWELL, M. C.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Disruption of the phosphate starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. **Planta**, v. 203, p. 67–74, 1997.

CEDERGREEN, N.; OLESEN, C. F. Can glyphosate stimulate photosynthesis? **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, p. 140-148, 2010.

CLAASSEN, N.; BARBER, S. A. A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. **Plant Physiology**, v. 54, n. 4, p. 564-568, 1974.

COPPEN, J. J. **The Genus *Eucalyptus***. Taylor and Francis e-Library, 2005. 450p.

CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JR., R. S.; MACIEL, C. D. G. Azafenidin: novo herbicida para o controle de plantas daninhas em *Eucalyptus camaldulensis*. **Planta Daninha**, v. 18, n. 3, p. 405-411, 2000.

CRUZ, M.B.; ALVES, P.L.C.A.; KARAM, D.; FERRAUDO, A.S. Capim-colonião e seus efeitos sobre o crescimento inicial de clones de *Eucalyptus x urograndis*. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 3, p. 391-401, 2010.

CUBERO, B.; NAKAGAWA, Y.; JIANG, X. Y.; MIURA, K. J.; LI, F.; RAGHOTHAMA, K. G.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. The phosphate transporter PHT4;6 is a determinant of salt tolerance that is localized to the golgi apparatus of *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 2, p. 535-552, 2009.

DARAM, P.; BRUNNER, S.; PERSON, B. L.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. **Planta**, v. 206, p. 225-233, 1998.

DENIS, M. H.; DELROT, S. Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. **Physiologia Plantarum**, v. 87, p. 569-575, 1993.

DILL, G. M.; CAJACOB, C. A.; PADGETTE, S. R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. **Pest Management Science**, v. 64, p. 326-331, 2008.

DING, L.; HOFIUS, D.; HAJIREZAEI, M. R.; FERNIE, A. R.; BORNKE, F.; SONNEWALD, U. Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3- dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 8, p. 2053-2067, 2007.

DUKE, S.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, p. 319-325, 2008.

DUMONT, F.; LOPES, R.; KREMERS, P. New polypeptides and in vitro translatable mRNAs are produced by phosphate starved cells of the unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Planta**, v. 182, n. 4, p. 610-616, 1990.

EKER, S.; OZTURK, L.; YAZICI, A.; ERENOGLU, B.; ROMHELD, V.; CAKMAK, I. Foliar-Applied glyphosate substantially reduced uptake and transport iron and manganese in sunflower plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 10019-10025, 2006.

ENTUS, R.; POLING, M.; HERRMANN, K. M. Redox regulation of Arabidopsis 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. **Plant Physiology**, v. 129, 1866–1871, 2002.

FASSBANDER, H. W. **Química de suelos com ênfasis em suelos de América Latina**. San Jose: IICA; 1986. 398 p.

FUCHS, M. A.; GEIGER, D. R.; REYNOLDS, T. L.; BOURQUE, J. E. Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* medikus). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 74, n. 1, p. 27-39, 2002.

GARCION, C.; LOHMANN, A.; LAMODIÈRE, E.; CATINOT, J.; BUCHALA, A.; DOERMANN, P.; MÉTRAUX, J. P. Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 147, 1279–1287, 2008.

GODOY, M. C. **Efeitos do glyphosate sobre o crescimento e absorção do fósforo pela soja**. 2007. 43 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Botucatu, 2007.

GOTTRUP, O.; O’SULLIVAN, P. A.; SHRAA, R. J.; VANDEN, W. H. Uptake, translocation, metabolism and selectivity of glyphosate in Canada thistle and leafy spurge. **Weed Research**, v. 16, n. 3, p.197-201, 1976.

GOUGLER, J. A.; GEIGER, D. R. Uptake and distribution of N-(phosphonomethyl) glycine in sugar beet plants. **Plant Physiology**, v. 68, n. 3, p. 668-672, 1981.

GRAVENA, R. **Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de citros atingidas pelo glyphosate**. 2006. 145 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

GRESPLAN, S. L.; DIAS, L. E.; NOVAIS, R. F. Crescimento e parâmetros cinéticos de absorção de amônio e nitrato por mudas de *Eucalyptus* spp. submetidas a diferentes relações amônio/nitrato na presença e ausência de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, n. 4, p. 667- 674, 1998.

GROSS, J.; CHO, W. K.; LEZHNEVA, L.; FALK, J.; KRUPINSKA, K.; SHINOZAKI, K.; SEKI, M.; HERRMANN, R. G.; MEURER, J. A plant locus essential for phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 25, p. 17189– 17196, 2006.

GUO, B.; JIN, Y. H.; WUSSLER, C.; BLANCAFLOR, E. B.; MOTES, C. M.; VERSAW, W. K. Functional analysis of the *Arabidopsis* PHT4 family of intracellular phosphate transporter. **New Phytologist**, v. 177, p. 889–898, 2008.

HENDERSON, P. J. F. The 12-transmembrane helix transportes. **Current Opinion of Cell Biology**, v. 5, p. 708-721, 1993.

HETHERINGTON, P. R.; MARSHALL, G.; KIRKWOOD, R. C.; WARNER, J. M. Absorption and efflux of glyphosate by cell suspensions. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 320, p. 527–533, 1998.

HINSINGER P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant Soil**, v. 237, p. 173–195, 2001.

HIRSCH, J.; MARIN, E.; FLORIANI, M.; CHIARENZA, S.; RICHAUD, P.; NUSSAUME, L.; THIBAUD, M. C. Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in *Arabidopsis* plants. **Biochimie**, n. 88, p. 1767–1771, 2006.

HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: its measurement and its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, v. 35, n. 2, 227-240, 1997.

HONEGGER, J. L.; BROOKES, J. M.; ANDERSON, E. J.; PORTER, C. A. Glyphosate transport in plants. In: CRONSHAW, J. (Ed.). **Phloem Transport**. New York: Liss, 1986. p. 609-618.

HORST, W. J.; KAMH, M.; JIBRIN, J.M.; CHUDE, V. A. Agronomic measures for increasing P availability to crops. **Plant Soil**, v. 237, n. 2, p. 211–233, 2001.

IBÁ – INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório IBÁ 2015. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf>. Acesso em: 20 de mar. 2016.

IBAOUI, H. E. I.; S. DELROT, S.; J. BESSON, J.; BONNEMAIN, J. L. Uptake and release of a phloem-mobile (glyphosate) and of a non phloem-mobile (iprodione) xenobiotic by broadbean leaf tissues. **Plant Physiology**, v. 24, p. 431, 1986.

JACHETTA, J. J.; APPLEBY, A. P.; BOERSMA, D. L. Apoplastic and symplastic pathways of atrazine and glyphosate transport in shoots of seedlings sunflower. **Plant Physiology**, v. 82, n. 4, p. 1000-1007, 1986.

KIM, H.; VAN OOSTENDE, C.; BASSET, G.; AND BROWSE, J. The AAE14 gene encodes the *Arabidopsis* o-succinylbenzoyl-CoA ligase that is essential for phylloquinone synthesis and photosystem I function. **The Plant Journal**, v. 54, n. 2, 272–283, 2008.

LEE, R. B. Control of net uptake of nutrients by regulation of influx in barley plants recovering from nutrient deficiency. **Annals of Botany**, v. 72, p. 223–230, 1993.

LÓPEZ-BUCIO, J.; MARTÍNEZ DE LA VEGA, O.; GUEVARA-GARCÍA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 450–453, 2000.

LYDON, J.; DUKE, S. O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 813-818, 1988.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Plant Biology**, v. 63, p. 73–105, 2012.

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

MARÍA, N.; FELIPE, M. R.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. Alterations induced by glyphosate on lupin photosynthetic apparatus and nodule ultrastructure and some oxygen diffusion related proteins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, n. 10-11, p. 985-996, 2005.

MATALLO, M. B.; ALMEIDA, S. D. B.; CERDEIRA, A. L.; FRANCO, D. A.; BLANCO, F. M.G.; MENEZES, P. T. C.; LUCHINI, L. C.; MOUTA, M. A. M.; DUKE, S. O. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. **Planta Daninha**, v. 27, p. 987-994, 2009.

MAXWEEL, K.; JOHNSON, G. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2011.

MELLO, A. A.; CARNIERI, C.; ARCE, J. E.; SANQUETTA, C. R. Planejamento florestal visando à maximização dos lucros e a manutenção do estoque de carbono. **Revista Cerne**, v. 11, n. 3, p. 205-217, 2005.

MIMURA, T. Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. **International Review of Cytology**, v. 190, p. 149-200, 1999.

MISSION, J.; RAGHOTHAMA, K. G.; JAIN, A.; JOUHET, J.; BLOCK, M. A.; BLIGNY, R.; ORTET, P.; CREFF, A.; SOMERVILLE, S.; ROLLAND, N.; DOUMAS, P.; NACRY, P.; HERRERRA-ESTRELLA, L.; NUSSAUME, L.; THIBAUD, M. C. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 11934–11939, 2005.

MOLDES, C. A.; MEDICI, L. O.; ABRAHÃO, O. S.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, R. A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 469-479, 2008.

MOREIRA, M. S.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da EPSPs (Grupo G). (3 Ed.). In: CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S. J. P.; CATANEO, A. C.; CARVALHO, J. C.; MOREIRA, M. S. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Piracicaba, HRAC, 2008. p. 78-96.

MORIN F.; VERA, V.; NURIT F.; TISSUT, M.; MARIGO, G. Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: role of a phosphate transporter. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 58, p. 13-22, 1997.

MUDGE, S. R.; RAE, A. L.; DIATLOFF, E.; SMITH, F. W. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 31, p. 341–353, 2002.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. T. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1999. 399p.

ORCARAY, L.; IGAL, M.; MARINO, D.; ZABALZA, A.; ROYUELA, M. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. **Pest Management Science**, v. 66, p. 262-269, 2010.

PEREZ-JONES, A.; PARK, K. W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.A. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, v. 226, p. 359-404, 2007.

PIPKE, R.; SCHULZ, A.; AMRHEIN, N. Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter* sp.. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 974–978, 1987.

PLAXTON, W. C.; CARSWELL, M. C. Metabolic aspects in phosphate starvation response in plant. In: Lerner, H. R. **Plant responses to environmental stresses from phytohormones to genome reorganization**. New York: Marcel Dekker; 1999.

POIRIER, Y.; BUCHER, M. Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. In SOMERVILLE, C. R. **The Arabidopsis Book**, Rockville: American Society of Plant Biologists, 2002.

PREISS, J. Starch, sucrose biosynthesis and partition of carbon in plants are regulated by orthophosphate and triose-phosphates. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 24-27, 1984.

PRESTON, C.; WAKELIN, A. M. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. **Pest Management Science**, v. 64, p. 372-376, 2008.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 665-686, 1999.

RAGHOTHAMA, K. G.; KARTHIKEYAN, A. S. Phosphate acquisition. **Plant and Soil**, v. 274, p. 37-49, 2005.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O.; NANDULA, V. K. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2125-2130, 2008.

SAKANO, K. Proton/phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of *Catharantus roseus* (L.) G. **Plant Physiology**, v. 67, p. 797-801, 1990.

SANTOS, L. D. T.; FERREIRA, F. A.; MEIRA, R. M. S. A.; BARROS, N. F.; FERREIRA, L. R.; MACHADO, A. F. L. Crescimento e morfoanatomia foliar de eucalipto sob efeito de deriva do glyphosate. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 133-142, 2005.

SANTOS JUNIOR, A.; TUFFI SANTOS, L. D.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R.; FELIX, R. C.; AMARAL, G. C.; CRUZ, L. R. Glyphosate drift in eucalyptus plants. **Planta Daninha**, v. 33, n. 3, p. 615-621, 2015.

SCHACHTMAN, D. P.; REID, R. J.; AYLING, S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, v. 116, 447-453, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013. 954p

TAN, S. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. **Amino Acids**, v. 30, n. 2, p.195-204, 2006.

TZIN, V.; GALILI, G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 956– 972, 2010.

UHDE-STONE, C.; GILBERT, G.; JOHNSON, J. M. F.; LITJENS, R.; ZINN, K. E.; TEMPLE, S. J.; VANCE, C. P.; ALLAN, D. L. Adaptation of white lupin to phosphorus deficiency involves enhanced expression of genes related to organic acid metabolism. **Plant Soil**, v. 248, p. 99-116, 2003.

ULLRICH, C.; NOVACKY, A. Extra and intracellular pH and membrane potential changes induced by K^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$, and NO_3^- uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnobium stoloniferum*. **Plant Physiology**, v. 94, p. 1561-1567, 1990.

USUDA, H.; SHIMOGAWARA, K. Phosphate deficiency in maize. VI. Changes in the two-dimensional electrophoretic patterns of soluble proteins from second leaf blades associated with induced senescence. **Plant & Cell Physiology**, v. 36, n. 6, p. 1149–1155, 1995.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. P. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, v. 157, p. 423–44, 2003.

VERSAW, W. K.; HARRISON, M.H. A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. **Plant Cell**, v.14, p. 1751–1766, 2002.

VIEIRA, D. C. M.; SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germinação de sementes de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 2, p. 183-188, 2007.

WALKER D. A.; SIVAK, M. N. Photosynthesis and phosphate: a cellular affair? *Trends in Biochemical Sciences*, v. 11, n. 4, p. 176-179, 1986.

WALLER, J. C.; AKHTARA, T. A.; LARA-NÚÑEZ, A.; GREGORY, J. F.; McQUINN, R. P.; GIOVANNONIC, J. J.; HANSON, A. D. Developmental and feedforward control of the expression of folate biosynthesis genes in tomato fruit. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 66–77, 2010.

WILDERMUTH, M.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F. Iso- chorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, v. 414, 562–565, 2001.

CAPÍTULO 2 - Cinética de absorção de fósforo e eficiência nutricional de macronutrientes em mudas de eucalipto

RESUMO - Florestas plantadas com clones de eucalipto mais eficientes na absorção, translocação e utilização de nutrientes podem colaborar na manutenção da sustentabilidade e na redução do custo das fertilizações e, conseqüentemente, dos custos de produção dos empreendimentos florestais. Nessa pesquisa, objetivou-se avaliar em mudas em solução nutritiva, a cinética de absorção de fósforo e as eficiências de absorção, translocação e utilização de macronutrientes e boro por mudas de clones de eucalipto e seus reflexos no crescimento das plantas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e câmara de crescimento, utilizando-se os clones de *Eucalyptus urophylla* GG100 e I144. De modo geral, observaram-se diferenças entre os clones quanto as características de crescimento, parâmetros cinéticos e eficiência nutricional. O clone I144 destacou-se por apresentar o maior crescimento e acúmulo de massa seca de raízes, característica importante para a absorção de nutrientes. Quanto aos parâmetros cinéticos de absorção de fósforo, o clone I144 também foi considerado superior, apresentando menores C_{\min} e K_m e maior V_{\max} , características consideradas ideais para a boa absorção de nutrientes. De um modo geral, as eficiências de absorção, translocação e utilização de macronutrientes também foram maiores no clone I144, com exceção da eficiência de utilização de potássio, superior no clone GG100. Não houve diferenças na eficiência nutricional dos clones em relação ao boro.

Palavras-chave: *Eucalyptus urophylla*, utilização de nutrientes, hidroponia, nutrição mineral, parâmetros cinéticos.

ABSTRACT - Forests planted with more efficient eucalypt clones in nutrients uptake, translocation and utilization can collaborate in sustainability maintenance, reducing the costs of fertilization, and consequently, production costs of forest enterprises. This research aimed to evaluate, in eucalypt seedlings and nutrient solution, the phosphorus uptake kinetic parameters and the macronutrients and boron uptake, translocation, and utilization efficiencies by eucalyptus clones. The experiment was

carried out in greenhouse and plant growth chamber using *Eucalyptus urophylla* clones GG100 and I144. In general, there were differences between clones for all parameters. The I144 clone presented the highest growth and roots dry mass, the last one an important feature for nutrients uptake. For kinetic parameters of phosphorus absorption, I144 clone was also considered superior, presenting lower C_{min} and K_m and higher V_{max} , characteristics considered essential for nutrients uptake. In general, the uptake, translocation, and utilization efficiencies of macronutrients were also higher in I144 clone, with the exception of potassium utilization efficiency, superior in GG100 clone. No differences in boron nutritional efficiency were found.

Keywords: *Eucalyptus urophylla*, nutrient, hydroponics, plant nutrition, kinetic parameters.

INTRODUÇÃO

As áreas cultivadas com eucalipto no Brasil mantêm há alguns anos a liderança no ranking global de produtividade florestal, com uma média de $39 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ em 2014. O Brasil é o maior produtor mundial de celulose proveniente de eucalipto, totalizando mais de 10 milhões de toneladas exportadas nesse mesmo ano. A importância da cultura na economia brasileira não pode ser desconsiderada, uma vez que cada hectare de árvores plantadas adicionou cerca de R\$ 7 mil ao PIB nacional em 2014 (IBÁ, 2015). A área cultivada com eucalipto, ainda em 2014, totalizou 5,56 milhões de hectares, localizados principalmente no Sudeste do País, mas de um modo geral, presente em todas as regiões do Brasil (IBÁ, 2015).

A deficiência de nutrientes é um dos fatores que pode reduzir o crescimento das plantas, sua produtividade, e conseqüentemente, comprometer a viabilidade do setor florestal no País, uma vez que o potencial produtivo não será completamente expressado em campo. As áreas florestais brasileiras geralmente apresentam teores limitantes de fósforo, potássio, cálcio e magnésio (SILVEIRA et al., 2004). Dentre todos os nutrientes, a deficiência de fósforo é um grande entrave para a agricultura

brasileira e mundial (BARBER et al., 1963; VANCE et al., 2003; SHEN et al., 2011, CROUS et al., 2015; dentre outros).

O fósforo é absorvido principalmente em sua forma oxidada, o fosfato (ou ortofosfato). Contudo, essa forma tem baixa mobilidade no solo e grande capacidade de associação com cátions (HIRSCH et al., 2006) e compostos orgânicos (LÓPEZ-BUCIO et al., 2000) e somente o fosfato livre na solução do solo pode ser absorvido. Assim, muitas vezes os solos têm quantidades de fosfato excedendo o necessário, mas indisponível e, portanto, limitante ao crescimento das plantas.

A fertilização poderia ser uma boa opção, mas cerca de 80% do fósforo aplicado via adubo será adsorvido ao solo rapidamente, e assim também ficará indisponível (BAYLE et al., 2011). A deficiência de fósforo compromete a produção de energia e, conseqüentemente o processo fotossintético e, conseqüentemente, a absorção dos demais nutrientes (SINGH et al., 2013). Assim, alternativas de manejo que permitam a escolha de materiais superiores quanto à absorção e o uso de fósforo – avaliados a partir da cinética de absorção e a eficiência nutricional de clones de eucalipto - são essenciais. Os parâmetros cinéticos de absorção iônica de nutrientes ($V_{m\acute{a}x}$, K_m e $C_{m\acute{i}n}$) têm sido apontados como fatores importantes na caracterização desses materiais (ANGHINONI et al., 1989).

A eficiência nutricional é a capacidade de um material genético de atingir um alto rendimento em solos com baixa disponibilidade de nutrientes. Uma alta eficiência nutricional pode resultar da maior eficiência de aquisição de nutrientes do solo (alta absorção mesmo em solos com baixa disponibilidade) e/ou da maior eficiência interna de utilização (alta produção de biomassa por unidade de nutriente absorvido) (MARSCHNER, 1995; RENGEL; DAMON, 2008).

A escolha de clones com maior eficiência nutricional pode ser uma estratégia para aumentar o aproveitamento dos nutrientes existentes no solo e dos fertilizantes utilizados, possibilitando assim recomendar clones para regiões específicas de acordo com a disponibilidade de nutrientes, diminuir as doses de fertilizantes, e, portanto, reduzir o custo de produção e aumentar a produtividade (PINTO et al., 2011). Clones mais eficientes nutricionalmente são alvos estratégicos para a manutenção da sustentabilidade florestal (BATISTA et al., 2015).

Nesse estudo, a cinética de absorção de fósforo foi realizada para os clones de *Eucalyptus urophylla* GG100 e I144 para compreender o comportamento desses quanto à absorção de fósforo, nutriente cuja deficiência no solo é problemática no Brasil e no mundo e difícil de ser revertida. No entanto, a seleção de um material não deve considerar apenas um nutriente ou apenas a absorção de nutrientes, razão pela qual as eficiências nutricionais de absorção, translocação e utilização de macronutrientes e boro também foram estudadas para ambos os clones.

Assim, aventa-se a hipótese de que a cinética de absorção de fósforo e as eficiências nutricionais de macronutrientes e boro variarão entre os clones de eucalipto e que essa estará correlacionada ao comportamento de outros nutrientes na planta, com consequências no crescimento das mudas.

Neste contexto, objetivou-se avaliar a cinética de absorção de fósforo e as eficiências de absorção, translocação e utilização de macronutrientes e boro por clones de eucalipto e seus reflexos no crescimento das plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e em câmara de crescimento no Laboratório de Plantas Daninhas (LAPDA), anexo ao Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal-SP.

Foram utilizados os clones GG100 (*Eucalyptus urophylla*, desenvolvido pela Gerdau) e I144 (um híbrido espontâneo de *E. urophylla* com uma espécie não identificada, desenvolvido pela Arcelormital), com 60 dias de idade. Ambos os clones são muito utilizados nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. As mudas do clone GG100 apresentavam, em média, 24,0 cm de altura; 3,5 mm de diâmetro; 10,0 folhas; 0,8 g de massa seca de folhas; 0,4 g de massa seca de caule e 2,7 g de massa seca de raiz. Já as mudas do clone I144 tinham, em média, 38,0 cm de altura; 4,1 mm de diâmetro; 12,0 folhas; 1,2 g de massa seca de folhas; 0,8 g de massa seca de caule e 2,8 g de massa seca de raiz.

As plantas se desenvolveram no sistema de hidroponia e, para tanto, foi utilizada a solução nutritiva proposta por Furlani et al. (1999) (Tabela 1). O cultivo

inicial das mudas foi realizado por um período de 28 dias em casa de vegetação, onde as plantas foram alocadas em caixas de plástico contendo 12 mudas e 12 litros de solução nutritiva com o pH ajustado para $6,0 \pm 0,2$ (HCl e/ou NaOH a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Com o intuito de promover a adaptação das mudas ao sistema hidropônico, foi realizado o aumento gradual e semanal da força iônica da solução. Inicialmente foi utilizada solução nutritiva com força iônica de 25% por sete dias, sendo substituída por uma nova solução com 50% de força iônica por mais sete dias, e assim consecutivamente até atingir 100% de força iônica (totalizando assim 28 dias de aclimatação em casa de vegetação). Durante este período, o pH da solução foi corrigido diariamente para $6,0 \pm 0,2$.

Tabela 1. Composição da solução nutritiva proposta por Furlani et al. (1999).

Solução nutritiva proposta por Furlani et al. (1999)	
macronutrientes	
----- mg L ⁻¹ de solução nutritiva -----	
Nitrogênio	202,0
Fósforo	31,5
Potássio	193,4
Cálcio	142,5
Magnésio	39,4
Enxofre	52,3
micronutrientes	
----- µg L ⁻¹ de solução nutritiva -----	
Boro	262,0
Cobre	38,0
Ferro	1800,0
Manganês	369,0
Molibdênio	65,0
Zinco	144,0

Ao final do período de aclimatação, as plantas foram visualmente selecionadas quanto à uniformidade da parte aérea e formação de raízes. As plantas selecionadas foram transferidas para câmara de crescimento com condições controladas (intensidade luminosa de $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; fotoperíodo de 12 horas; temperatura entre 24 e 26 °C e umidade relativa entre 60 e 70%). Cada planta foi

alocada, individualmente, em uma caixa de plástico com capacidade para 2,5 litros (15,0 x 15,0 x 10,0 cm), representando uma unidade experimental.

Assim, os tratamentos foram compostos por dois clones de *E. urophylla*, GG100 e I144, dispostos em um delineamento inteiramente casualizado com seis repetições.

Para iniciar a cinética de absorção de fósforo as plantas foram mantidas em solução nutritiva com força iônica ajustada para 10% de fósforo por cinco dias, visando aumentar a capacidade das plantas de absorver este elemento (LIMA et al., 2005). O pH desta solução também foi corrigido a cada dois dias como anteriormente descrito.

Após esse período, as raízes das plantas foram lavadas com água destilada e uma solução denominada solução de pré-exaustão foi adicionada às caixas. Essa solução teve sua concentração de fósforo ajustada para $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ (essa concentração de fósforo foi determinada em testes preliminares, de modo a permitir que a solução atingisse a menor concentração de fósforo (C_{min}) no tempo de 24 horas). As plantas permaneceram nessa solução por duas horas, com a finalidade de atingir o estado estacionário de absorção (EPSTEIN; HAGEN, 1952). Esta solução também teve o pH ajustado para $6,0 \pm 0,2$. Posteriormente, realizou-se a troca desta solução por outra de igual composição, mas agora chamada de solução de depleção.

O método empregado para a determinação dos parâmetros cinéticos foi a quantificação da redução na concentração de nutriente da solução de depleção em função de sua absorção pelas plantas (CLAASSEN; BARBER, 1974). Para isso, foram coletadas alíquotas de 2 mL da solução de depleção, sendo a primeira coletada no “tempo zero”, e as demais em intervalos de uma hora, por um período de 12 horas. A última coleta foi efetuada às 24 horas após o início do período de amostragem. A cada amostragem foi medido o pH (Analion®, modelo PM602) da solução nutritiva remanescente nas caixas.

Após a realização da última amostragem na solução de depleção mensurou-se a altura, o diâmetro, o número de folhas e a área foliar das plantas, que foram separadas em folhas, caules e raízes. Também foram determinadas a massa fresca das raízes e o volume de solução nutritiva remanescente nas caixas. O material

vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C durante cinco dias. As massas secas foram determinadas e em seguida, folhas, caules e raízes foram triturados em micromoinho tipo Willey utilizando peneira de 40 mesh, para posterior determinação dos teores de nutrientes.

O teor de fósforo foi determinado nas folhas, caules e raízes das plantas (método colorimétrico do metavanadato) e na solução de depleção (por colorimetria, segundo MURPHY; RILEY, 1962). No tecido vegetal também foram determinados os teores de nitrogênio (método semi-micro-Kjeldahl) (TEDESCO et al., 1995); potássio (fotometria de chama) (ALCARDE; BORELLA, 1976); cálcio, magnésio (ambos por espectrofotometria de absorção atômica) e boro (colorimetria da azometina H) (MALAVOLTA et al., 1997).

Os valores de pH foram submetidos a análise de regressão, e foi utilizado o modelo exponencial. O modelo exponencial também foi empregado na determinação das curvas de depleção de fósforo (software Microcal Origin 8.0®).

O valor de C_{\min} (concentração mínima) foi a menor concentração de fósforo observada na curva de depleção. Os teores de fósforo na solução de depleção, em cada tempo de amostragem, bem como os dados relativos ao volume inicial e final de solução e o de massa fresca de raízes foram utilizados para o cálculo dos parâmetros cinéticos V_{\max} (velocidade máxima de absorção) e K_m (constante de Michaelis-Menten) no software Cinética 2.0® (RUIZ; FERNANDES FILHO, 1992). Esse software calcula a V_{\max} por meio de uma equação linear e a K_m por equações do tipo exponencial, potencial ou exponencial-recíproco. A equação do modelo potencial foi à escolhida, uma vez que apresentou melhor ajuste aos dados, apresentando maiores valores para o coeficiente de determinação em todas as repetições. O “poder de absorção de fósforo” - α foi calculado pela divisão da V_{\max} pelo K_m (MARSCHNER, 1995).

As características de crescimento (altura, diâmetro do caule, número de folhas e área foliar), as massas secas (folhas, caule, raízes, parte aérea e total), a relação entre massa seca da parte aérea e massa seca de raízes e os parâmetros cinéticos (V_{\max} , K_m , C_{\min} e α – poder de absorção) foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade com o auxílio do programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011).

A eficiência nutricional dos clones GG100 e I144 foi avaliada por meio da eficiência de absorção - EA (SWIADER et al., 1994), da eficiência de translocação - ET (LI et al., 1991) e da eficiência de utilização - EU (SIDDIQUI; GLASS, 1981). Para tal foram utilizadas as equações 1, 2 e 3.

$$EA = (\text{mg do nutriente na planta/g de matéria seca da raiz}) (1)$$

$$ET = (\text{mg do nutriente na parte aérea/mg do nutriente na planta}) (2)$$

$$EU = (\text{g matéria seca total})^2/\text{mg do nutriente na planta} (3)$$

As eficiências nutricionais foram calculadas para nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e boro. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Tukey a 5%, com o auxílio do programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS

Características de crescimento

Diferenças significativas foram constatadas quanto às características de crescimento dos clones GG100 e I144. O clone I144 apresentou maior altura, diâmetro e área foliar e, conseqüentemente, maior massa seca de caule, de parte aérea, das raízes e total. A altura, a área foliar e a massa seca total foram, respectivamente, 44,2; 24,6 e 19,9% maiores no clone I144 quando comparado ao GG100 (Tabela 2). Essas características refletem a avaliação inicial, realizada antes da instalação do experimento, momento em que as mudas do clone I144 já eram maiores que as mudas do clone GG100.

Tabela 2. Altura (H), diâmetro do caule (D), número de folhas (NF), área foliar (AF), massa seca de folhas (MSF), de caule (MSC), da parte aérea (MSPA), de raízes (MSR) e total (MST) e relação entre massa seca da parte aérea e de raízes (MSPA/MSR) nas plantas do clone GG100 e I144.

Clones	H cm	D mm	NF	AF cm ²	MSF g
GG100	35,62 B ¹	4,97 B	73,75 A	1915,00 B	4,67 A
I144	51,37 A	5,86 A	84,25 A	2386,50 A	5,55 A
F	82,97**	96,34**	2,25 ^{NS}	33,35**	4,57 ^{NS}
DMS ²	4,2330	0,2212	17,1220	19,7885	0,9960
CV (%) ³	5,62	2,35	12,53	5,37	11,29
Clones	MSC	MSPA	MSR	MST	MSPA/MSR
	----- g -----				
GG100	2,38 B	9,06 B	9,60 B	18,67 B	0,94 A
I144	3,36 A	10,91 A	11,48 A	22,39 A	0,95 A
F	23,46**	16,08**	70,41**	43,49**	0,86 ^{NS}
DMS	0,4950	1,1210	0,5425	2,3813	0,1001
CV (%)	9,92	8,17	3,01	4,32	7,72

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação das médias entre os clones. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A massa seca de raízes foi 19,5% maior no clone I144 quando comparado ao clone GG100. Já para as características número de folhas, massa seca de folhas e relação massa seca da parte aérea/massa seca de raízes, não foram constatadas diferenças significativas (Tabela 2).

Cinética de absorção de fósforo

O pH da solução de depleção foi ajustado para 6,01 na ocasião do seu preparo. Após o início da cinética e com o contato da solução com as raízes das plantas, o pH da solução apresentou uma redução exponencial em função do tempo. Para o clone GG100, ao final de 12 horas o valor do pH da solução de depleção foi de 4,41. Às 24 horas após o início da cinética, o pH da solução de depleção foi 4,45 (Figura 1).

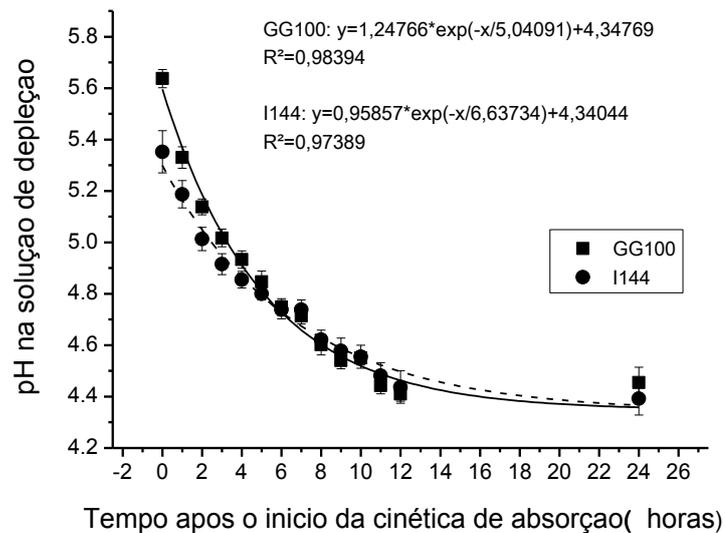


Figura 1. Potencial hidrogeniônico (pH) da solução de depleção ao longo das 24 horas após o início da cinética de absorção de fósforo para os clones GG100 e I144.

Assim que a solução foi colocada nas caixas para a cinética do clone I144 (tempo zero), o pH da solução foi reduzido para o valor médio 5,35. Após 12 horas, o pH médio foi de 4,43. Às 24 horas após o início da cinética de absorção para o clone I144 o pH da solução de depleção foi de 4,39 (Figura 1).

No final da cinética de absorção, o volume médio da solução de depleção nas caixas para o clone GG100 foi de, aproximadamente, 1,20 litros. Já para o clone I144, o volume médio da solução de depleção nas caixas foi de aproximadamente 1,23 litros. Dessa forma, as plantas dos clones GG100 e I144 absorveram, em média, 300 e 270 mL em 24 horas (inicialmente foram colocados 1,5 litros de solução de depleção em cada caixa de cultivo). Contudo, não foram constatadas diferenças estatísticas entre o volume absorvido para cada clone (Tabela 3).

Os teores de fósforo (P) na solução de depleção não foram estatisticamente diferentes às 0, 1, 2, 3 e 11 horas após o início da cinética. Em todos os outros momentos, o maior teor de P foi mensurado na solução de depleção das plantas do clone GG100, indicando a menor absorção desse material (Tabela 3).

Tabela 3. Volume final de solução de depleção (VFS) e teores de fósforo na solução de depleção ao longo da cinética de absorção (em horas após o início da cinética) para os clones GG100 e I144.

Clones	VFS	0 hora	1 hora	2 horas	3 horas
	L	----- $\mu\text{mol L}^{-1}$ -----			
GG100	1,20 A ¹	19,37 A	19,30 A	19,05 A	18,91 A
I144	1,23 A	20,22 A	19,54 A	18,79 A	17,57 A
F	2,605 ^{NS}	2,001 ^{NS}	5,593 ^{NS}	9,088 ^{NS}	9,234 ^{NS}
DMS ²	0,0401	20,317	13,350	0,5413	13,785
CV (%) ³	2,01	3,20	2,10	0,87	2,28
Clones	4 horas	5 horas	6 horas	7 horas	8 horas
	----- $\mu\text{mol L}^{-1}$ -----				
GG100	17,51 A	15,80 A	14,78 A	13,78 A	13,34 A
I144	14,48 B	13,87 B	11,46 B	11,35 B	11,11 B
F	360,968 ^{**}	371,311 ^{**}	214,755 ^{**}	201,475 ^{**}	92,138 ^{**}
DMS	16,365	12,973	14,032	11,142	1,32
CV (%)	3,05	2,57	3,09	2,53	3,03
Clones	9 horas	10 horas	11 horas	12 horas	24 horas
	----- $\mu\text{mol L}^{-1}$ -----				
GG100	13,52 A	13,06 A	11,77 A	11,56 A	10,17 A
I144	10,95 B	11,61 B	11,12 A	10,82 B	8,78 B
F	79,492 ^{**}	7,442 ^{**}	2,551 ^{NS}	10,393 ^{**}	605,354 ^{**}
DMS	12,929	17,283	14,976	0,9669	12,556
CV (%)	2,92	3,05	3,50	2,28	2,37

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coefficiente de variação das médias entre os clones. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A curva de depleção de fósforo para os clones GG100 e I144 permite observar como ocorreu a absorção de fósforo ao longo das 24 horas de cinética. Grande parte do P fornecido inicialmente na solução de depleção ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi absorvida nas 24 horas de duração do estudo de cinética de absorção, sendo grande parte dele absorvido nas 12 horas iniciais. Para o clone GG100, 12 horas após o início da cinética, o volume remanescente de P na solução foi de $11,56 \mu\text{mol L}^{-1}$. Na última coleta restaram apenas $10,17 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P na solução de depleção. Assim, as plantas do clone GG100 absorveram 42,2% do P disponível nas primeiras 12 horas, e 6,9% de P nas 12 horas posteriores (Figura 2).

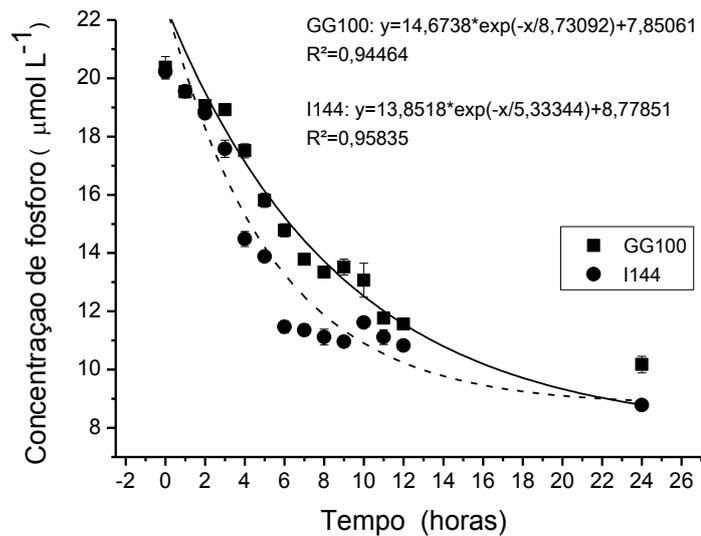


Figura 2. Curva de depleção de fósforo durante a cinética de absorção para os clones GG100 e I144.

Para o clone I144, 12 horas após o início da cinética foram quantificados $10,82 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P, que representaram uma absorção de 54,1% do P disponível. Às 24 horas após o início da cinética, restaram $8,78 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P, que corresponderam a 56,1% de absorção. Nas últimas 12 horas foram absorvidos 10,2% do total de P inicialmente fornecido (Figura 2).

Ainda a partir das curvas de depleção de P foi possível inferir o $C_{\text{mín}}$, que para o clone GG100 foi $10,17 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para o clone I144 foi de $8,78 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2).

O K_m (concentração de P na qual foi atingida metade da velocidade máxima) e o $C_{\text{mín}}$ (quantidade mínima em que as raízes podem extrair um nutriente a partir da solução de depleção) foram 26,7 e 15,8% maiores no clone GG100. Já a $V_{\text{máx}}$ (quantidade de P absorvida quando todos os carregadores estiverem saturados) e o α (poder de absorção de P) foi 66,7% maiores no clone I144 (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros cinéticos K_m , $C_{mín}$, $V_{máx}$ e α para os clones GG100 e I144.

Clones	K_m	$C_{mín}$	$V_{máx}$	α
	$\mu\text{mol L}^{-1}$	--- $\mu\text{mol g}^{-1}\text{L}^{-1}$ ---		
GG100	12,84 A ¹	10,17 B	0,15 A	0,011 B
I144	10,14 B	8,78 A	0,25 B	0,024 A
F	382,76**	813,51**	342,85**	306,24**
DMS ²	0,3376	0,1349	0,0132	0,0018
CV(%) ³	1,70	0,82	3,77	5,73

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação das médias entre os clones. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Eficiências nutricionais

As eficiências de absorção, de translocação e de utilização de nitrogênio (N) foram 28,9; 3,3 e 40,0%, respectivamente, maiores no clone I144 (Tabela 5). A eficiência nutricional de P também foi maior nas plantas no clone I144: as eficiências de absorção, translocação e utilização desse nutriente foram 31,6; 6,8 e 16,7% maiores quando comparadas as do GG100 (Tabela 5).

As eficiências de absorção e de translocação de potássio (K) pelos clones GG100 e I144 não apresentaram diferenças significativas. Contudo, a eficiência de uso de K foi 8,6% maior no clone GG100. Para cálcio (Ca) diferenças estatísticas foram encontradas para a eficiência de translocação e de utilização, e o clone I144 foi superior ao GG100. A maior diferença foi constatada para a eficiência de uso de Ca, que foi 5,5% maior no clone I144 (Tabela 5).

Não foram observadas diferenças significativas entre os clones GG100 e I144 quanto à absorção e translocação de magnésio (Mg). No entanto, a eficiência de uso de magnésio pelo clone I144 foi 22,2% maior quando comparado ao clone GG100. Não foram constatadas diferenças entre as eficiências de absorção, translocação e uso de boro (B) entre os clones GG100 e I144 (Tabela 5).

Tabela 5. Eficiências de absorção (EA), translocação (ET) e utilização (EU) de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e boro em clones de eucalipto.

Clones	EA	ET	EU	EA	ET	EU
	mg g ⁻¹		g ² mg ⁻¹	mg g ⁻¹		g ² mg ⁻¹
	nitrogênio			fósforo		
GG100	200,21 B ¹	0,90 B	0,10 B	17,59 B	0,88 B	5,63 B
I144	258,21 A	0,93 A	0,14 A	23,15 A	0,94 A	6,57 A
F	1042,91**	29,52**	27,87**	214,00**	36,60**	79,15**
DMS²	4,9810	0,0102	0,0349	1,0523	0,0223	0,0899
CV (%)³	0,96	0,51	1,01	2,28	1,26	2,36
Clones	EA	ET	EU	EA	ET	EU
	mg g ⁻¹		g ² mg ⁻¹	mg g ⁻¹		g ² mg ⁻¹
	potássio			cálcio		
GG100	55,48 A	0,80 A	1,01 A	46,32 A	0,72 B	1,62 B
I144	57,61 A	0,79 A	0,93 B	48,3 A	0,76 A	1,76 A
F	0,87 ^{NS}	0,24 ^{NS}	21,85**	0,47 ^{NS}	4,55*	9,73*
DMS	6,3140	0,0867	0,0610	8,0428	0,0415	0,1225
CV (%)	4,92	5,58	5,36	7,50	2,87	7,84
Clones	EA	ET	EU	EA	ET	EU
	mg g ⁻¹		g ² mg ⁻¹	mg g ⁻¹		g ² mg ⁻¹
	magnésio			boro		
GG100	15,92 A	0,72 A	1,80 B	5,10 A	0,98 A	211,64 A
I144	16,60 A	0,76 A	2,20 A	5,13 A	0,99 A	269,35 A
F	0,47 ^{NS}	4,55 ^{NS}	9,73*	0,00 ^{NS}	0,17 ^{NS}	7,68 ^{NS}
DMS	2,7640	0,0437	0,3530	0,0317	0,0613	58,0182
CV (%)	7,50	2,87	7,84	10,00	3,65	8,64

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³ Coeficiente de variação das médias entre os clones. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Características de crescimento

Foram constatadas diferenças significativas entre as características de crescimentos dos clones GG100 e I144. No entanto, essas diferenças já foram observadas no momento da instalação do experimento, indicando que os clones (ambos com 60 dias de idade) tem potenciais de crescimento diferentes.

Diferenças nas características de crescimento e produção de massa seca entre clones de eucalipto são comuns na literatura, inclusive em estudos de cinética de absorção de nutrientes (BARROS; NEVES; NOVAIS, 2004; LIMA et al., 2005; PINTO et al., 2011, dentre outros). Embora estes clones tenham sido submetidos a diversos testes por longos anos durante o processo de melhoramento genético, diferenças de produção de biomassa são comuns, e junto com outras características visuais e fisiológicas confirmam as diferenças entre clones de eucalipto.

Dentre as características de crescimento, a massa seca das raízes é de extrema importância, já que está intrinsecamente ligada a absorção de nutrientes, uma vez que a absorção de nutrientes é proporcional ao volume de solo ocupado pelas raízes (ERNANI et al., 1994). O maior acúmulo de massa seca geralmente evidencia um grande volume radicular. A exploração de um grande volume de solo pelas raízes é importante principalmente para a absorção dos nutrientes que se deslocam pelo mecanismo de difusão e interceptação radicular (VILELA; ANGHINONI, 1984). O fósforo e o potássio são exemplos de nutrientes absorvidos por difusão; já a interceptação radicular é essencial para a absorção de cálcio. A maior capacidade do clone I144 quanto ao desenvolvimento do sistema radicular pode ser interpretada como uma habilidade adaptativa para absorver nutrientes mais eficientemente (MENGEL; BARBER, 1974), corroborando os resultados apresentados nessa pesquisa.

Apesar das diferenças na massa seca das raízes, a relação massa seca da parte aérea e de raízes foi estatisticamente igual para os clones I144 e GG100. Essa é uma informação muito relevante, pois evidencia o investimento relativo de fotoassimilados para o crescimento de uma região específica da planta (BATISTA et al., 2015). Nesse estudo, a relação massa seca da parte aérea e de raízes foi superior a 0,90 para os dois clones. Valores próximos a 1,0 são considerados por muitos pesquisadores ideais: as plantas estão “investindo” de modo semelhante no crescimento do sistema radicular e parte aérea.

Um maior investimento no crescimento do sistema radicular pode ser benéfico em condições de baixo nível de água ou nutrientes no solo, pois haverá maior área de raiz para suprir as necessidades da planta (REIS et al., 2006). Por outro lado, a maior translocação de fotoassimilados para o sistema radicular pode limitar o

desenvolvimento vegetativo da parte aérea, diminuindo a área fotossinteticamente ativa e, logo, o desenvolvimento da planta. Já um alto investimento na parte aérea em detrimento ao crescimento do sistema radicular pode prejudicar a absorção de nutrientes cujo contato raiz-solo é fundamental, como cálcio. Esses nutrientes são “interceptados” pelas raízes e, portanto, sua absorção é dependente do volume do sistema radicular.

Cinética de absorção de fósforo

A redução do pH da solução de depleção ao longo das 24 horas da cinética pode estar relacionada a liberação de ácidos orgânicos pelas raízes, responsáveis pela acidificação do meio. Além disso, o processo respiratório das plantas libera CO_2 , que pode se transformar em ácido carbônico, contribuindo para a acidificação da solução nutritiva. A redução do pH foi um indicativo que as plantas estavam bem adaptadas ao sistema e realizando todas suas funções normalmente, condições ideais para um estudo cinético.

O menor pH da solução de depleção do clone I144 observado nas primeiras 4 horas após o início da cinética pode estar associada a maior atividade respiratória das raízes para prover energia para a absorção de outros nutrientes e o próprio crescimento radicular, com conseqüente maior liberação de ácidos orgânicos na solução, que, conseqüentemente, reduzem o pH.

O clone I144 apresentou maior capacidade de absorção de P em função do tempo quando comparado ao clone GG100. Diferenças quanto à capacidade de absorver nutrientes podem ser decorrentes de variações na morfologia das raízes, nos parâmetros cinéticos de absorção ($V_{\text{máx}}$, K_m e $C_{\text{mín}}$) e na eficiência nutricional.

O $C_{\text{mín}}$ é a concentração limite abaixo da qual a planta é incapaz de absorver um elemento na solução. Esse parâmetro cinético foi menor para o clone I144. De um modo geral, baixos valores para $C_{\text{mín}}$ podem ser indicativos de materiais adaptados a ambientes adversos, como locais com carência de nutrientes. Assim, clones com os menores $C_{\text{mín}}$ possivelmente absorverão nutrientes mesmo quando esses estiverem em baixa disponibilidade no meio.

É importante salientar que em cinéticas realizadas em sistema hidropônico a importância do C_{\min} é reduzida, pois o nutriente está disponível em quantidade ideal, na forma adequada para absorção e sem restrições de água. Portanto, não há limitação na chegada dos nutrientes às raízes, e parâmetros cinéticos como K_m e V_{\max} têm maior peso na avaliação da absorção de nutrientes. Nas cinéticas realizadas utilizando-se solos nutricionalmente carentes ou em períodos de déficit hídrico, o C_{\min} exerce maior influência na absorção (HORN et al., 2006).

A V_{\max} (velocidade máxima de absorção) foi maior para o clone I144, e o K_m (constante de Michaelis-Menten) foi maior no clone GG100. O K_m é o inverso da afinidade do transportador pelo nutriente (EPSTEIN; BLOOM, 2006) e equivale à concentração do nutriente na solução onde foi atingida metade da V_{\max} . Quanto maior o K_m menor a afinidade do P com os sítios de absorção e, portanto, menor a eficiência de absorção de P.

Uma planta eficiente nutricionalmente na absorção de P seria aquela que apresentasse uma alta taxa inicial de absorção, decorrente de alta afinidade do carregador com o P (baixo K_m) e atingisse uma concentração mínima baixa (baixo C_{\min}), extraindo o máximo possível do P da solução (NIELSEN; BARBER, 1978; HORN et al., 2006). Plantas com maior V_{\max} e menor K_m também são consideradas superiores tanto em alta quanto em baixa disponibilidade de nutrientes.

Em condições de campo, e especificamente para P, menores valores de K_m são mais convenientes que grandes valores de V_{\max} , uma vez que as concentrações de P normalmente encontradas na solução dos solos brasileiros não são suficientes para obter altos valores de V_{\max} (NOVAIS; MELLO, 2007). Independentemente do conceito de “planta ideal”, os parâmetros cinéticos demonstraram que o clone I144 foi o mais eficiente na absorção de P.

Muitas vezes compreender e comparar os parâmetros cinéticos, principalmente quando vários materiais são avaliados, pode ser difícil. Assim, surgiu o conceito de “poder de absorção” - α , (V_{\max}/K_m), que pode ser considerado como a eficiência de absorção específica (MARSCHNER, 1995). Quanto maior o α , maior será a taxa de absorção por unidade de raiz. A eficiência de absorção de um nutriente será maior quanto maior for o V_{\max} e menor for o K_m . Dessa forma o

parâmetro α , sendo a razão dos dois, é uma expressão direta dessa eficiência e reflete o maior valor de $V_{m\acute{a}x}$ apresentado pelo clone I144.

Na literatura, os parâmetros cinéticos da absorção de P para eucalipto variaram entre 0,57 e 1,72 $\mu\text{moles g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para a $V_{m\acute{a}x}$; entre 1,15 a 1,29 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o K_m e entre 0,23 e 2,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o $C_{m\acute{i}n}$ (FURTINI NETO, 1994). Os valores apresentados por esse pesquisador diferem dos aqui calculados. No entanto, deve-se ressaltar que foram obtidos para outros clones e a cinética foi realizada com elemento marcado (^{32}P), tornando difícil a comparação de valores.

Já Pinto (2009) obteve valores bem próximos aos encontrados nessa pesquisa. Os valores de K_m oscilaram entre 13,3 e 15,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, valores de $C_{m\acute{i}n}$ entre 8,6 e 12,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e valores de $V_{m\acute{a}x}$ entre 0,15 e 0,24 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Ambos os experimentos foram conduzido em condições muito semelhantes, com clones de eucalipto “atuais” e oriundos de propagação vegetativa. Entretanto, a pesquisadora utilizou a solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975) e a cinética de absorção foi realizada “conjuntamente” para P, K, Ca e Mg.

Por meio dos parâmetros cinéticos apresentados e da discussão da escolha de uma “planta ideal”, o clone I144 foi superior na absorção de P quando comparado ao clone GG100.

Também é fundamental avaliar a eficiência na translocação e utilização desse nutriente. E, para uma escolha segura desse clone em detrimento de outros, é essencial conhecer a eficiência nutricional de absorção, translocação e utilização de outros nutrientes.

Eficiências nutricionais

A eficiência nutricional pode ser compreendida como a capacidade das plantas de absorver, translocar e utilizar nutrientes. Na fase jovem, a eficiência de absorção é mais importante e durante todo o restante do ciclo da planta uma boa eficiência de utilização é fundamental (BARROS; NOVAIS, 1990).

Os clones GG100 e I144 apresentaram diferenças quanto à eficiência nutricional (eficiências de absorção, translocação e utilização). Diferenças nessas características foram constatadas anteriormente para clones de eucalipto por Pinto

et al. (2011) e por Lima et al. (2005). Esse comportamento diferenciado de materiais “semelhantes” cultivados sob mesma condição pode indicar, além das diferenças anteriormente expostas, diferenças nos fatores internos responsáveis pela eficiência nutricional (MARTINEZ et al., 1993).

As eficiências de absorção, translocação e utilização de N e P foram maiores no clone I144. O N e o P são nutrientes muito requeridos pelas plantas e, conseqüentemente, limitantes ao seu crescimento. Na fase de muda, esses nutrientes são essenciais para garantir o rápido crescimento radicular do eucalipto (BARROS; NEVES; NOVAIS, 1997). Esses nutrientes também são os que mais afetam a produção de raízes quando fornecidos em quantidades insuficientes (CLARKSON, 1985).

Na área florestal brasileira, uma grande capacidade de absorção de nutrientes é importante nos povoamentos recém-implantados, permitindo uma maior taxa de recuperação dos nutrientes aplicados via fertilização (BARROS et al., 1986). Uma vez que a eficiência de utilização é a característica mais importante na produção de biomassa e, conseqüentemente, na produtividade de madeira, elevadas eficiências de utilização são imprescindíveis em plantas adultas de espécies florestais.

A menor eficiência de utilização de N e P pelo clone GG100 pode estar relacionada à maior necessidade desses nutrientes para as reações bioquímicas da planta, à menor redistribuição do nutriente para os pontos de crescimento e à menor mobilização de N e P (PINTO, 2009).

As eficiências de absorção e translocação de K foram estatisticamente iguais entre os clones GG100 e I144. A absorção de K pelo plasmalema das células das raízes é um processo altamente eficiente. Assim, a absorção raramente é uma etapa limitante na aquisição de K em meios com teores adequados do nutriente. Além disso, a demanda por K aumenta com o acúmulo de biomassa e, portanto, com a idade das plantas (BARROS et al., 1990). A eficiência de utilização de K foi maior no clone GG100, demonstrando que esse material pode produzir mais biomassa absorvendo e translocando a mesma quantidade desse nutriente que o clone I144.

O K é um nutriente abundante nas plantas, já que em condições de boa fertilidade de solo é absorvido em grande quantidade pelas raízes. Tem função essencial no estado energético da planta, na translocação e armazenamento de

fotoassimilados e na manutenção da água nos tecidos vegetais (MEURER, 2006). No entanto, muitas das áreas florestais brasileiras têm carência de K (SILVEIRA et al., 2004). Assim, o clone GG100 – que apresentou maior eficiência na utilização de K – é um material interessante para áreas com quantidades críticas de K ou para ser utilizado em programas de melhoramento genético.

As eficiências de translocação e utilização de Ca também foram significativamente superiores no clone I144. A eficiência de translocação dos nutrientes da raiz para a parte aérea é responsável pela manutenção da demanda por nutrientes dos sítios fotossinteticamente ativos da planta (ABICHEQUER; BOHNEN, 1998). A movimentação de íons das raízes até o xilema envolve vários mecanismos que podem limitar sua ascensão para a parte aérea – entre eles, diferenças genótípicas (GERLOFF; GABELMAN, 1983), explicando assim a diferenças dessa característica nos clones.

Para o eucalipto, uma boa eficiência de translocação de Ca é essencial, uma vez que esse nutriente é bastante demandado para o processo de divisão celular (CUNHA et al., 2009). Do total de Ca absorvido, 50% ou mais será translocado e permanecerá no tronco das árvores e, portanto, estará relacionado à produtividade do eucalipto (GRESPLAN et al., 1998). Dessa forma, baixas eficiências de absorção, translocação e utilização de Ca podem comprometer a produção de madeira.

Também não foram observadas diferenças significativas entre os clones quanto à absorção e translocação de magnésio (Mg). Já a eficiência de utilização de Mg foi maior no clone I144. Geralmente baixos teores de Mg são suficientes para atender as demandas nutricionais do eucalipto. A exceção ocorre apenas nas áreas de Cerrado, que podem apresentar deficiência desse nutriente, e a alocação do clone I144 nessas áreas poderá colaborar no melhor uso do Mg disponível.

Não foram constatadas diferenças estatísticas entre os clones GG100 e I144 para as eficiências de absorção, translocação e uso de B. Existem evidências de que esse nutriente possa estar associado à qualidade da madeira, já que atua no crescimento dos meristemas e na formação da parede celular – especificamente na síntese de pectina, lignina e celulose (MARSCHNER, 1995).

De um modo geral (com exceção da eficiência de utilização de K), a eficiência nutricional do clone I144 foi superior a do clone GG100. Considerando-se que o

comportamento da eficiência nutricional dos clones não seja alterado durante o ciclo de cultivo do eucalipto, pode-se inferir que o clone I144 necessita de menores investimentos na adubação devido à maior taxa de recuperação (absorção) dos nutrientes, e maior eficiência na conversão destes em produção de biomassa.

As eficiências de absorção e utilização de K, Ca e Mg foram estudadas em clones de *Eucalyptus grandis* e em híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*. As eficiências de absorção para esses nutrientes oscilaram entre 42,7 e 85,9 mg g⁻¹ para K; entre 20,8 e 45,9 mg g⁻¹ para Ca e entre 6,9 e 10,7 mg g⁻¹ para Mg. Já as eficiências de uso variaram entre 1,2 e 1,5 g² mg⁻¹ para K; entre 3,2 e 3,6 g² mg⁻¹ para Ca e entre 8 e 14,7 g² mg⁻¹ para Mg (LIMA et al, 2005). Além de avaliarem clones diferentes, os pesquisadores também utilizaram a solução nutritiva de Clark.

Por meio da comparação de seis clones de eucalipto, Pinto et al. (2011) também concluíram que o clone I144 foi mais eficiente nutricionalmente, principalmente para N, P, K, Mg e S, com maior eficiência na absorção e na utilização destes nutrientes na produção de biomassa. De um modo geral, as eficiências nutricionais obtidas no artigo supracitado foram próximas às obtidas nessa pesquisa. Bons resultados na produção de biomassa em plantios comerciais do clone I144 também foram relatados por Pinto et al. (2011).

A maior eficiência nutricional de um clone pode ser atribuída a inúmeros fatores já discutidos anteriormente, e inclusive pode ser relacionado à massa seca de raízes. A velocidade de absorção de nutrientes é função do número de carregadores e de sua velocidade de giro e, nesse contexto, o volume do sistema radicular resulta em maior número de sítios de absorção, com consequentes alterações nos parâmetros cinéticos de absorção (FONTES; BARBER, 1984; CLARKSON, 1985). Nesse experimento, o clone I144 apresentou maior massa seca de raízes e, conseqüentemente, maior afinidade e maior eficiência de absorção de P, e maiores eficiências na absorção, translocação e uso de alguns nutrientes.

A eficiência nutricional é um fator de grande relevância para a alocação de materiais em sítios com distintas disponibilidades de nutrientes e para o estabelecimento de um plano de fertilização. Ambos os fatores são essenciais para a cultura do eucalipto, uma vez que essa cultura vem sendo cultivada em várias condições edafoclimáticas e a redução do uso de fertilizantes implicará na redução

dos custos de produção e, conseqüentemente, no aumento na lucratividade. Materiais com altas eficiências nutricionais podem ainda reduzir o risco de exaustão dos nutrientes no solo, mantendo o potencial produtivo ao longo ciclo da cultura do eucalipto.

É importante ressaltar que o cultivo de materiais altamente eficientes na absorção de um nutriente em solos pobres que não receberam adubação pode causar o empobrecimento do solo (SANTANA et al., 2002). Assim, conhecer a eficiência nutricional de um material é necessário não só para sua alocação em campo, mas também para o uso e manejo racional dos solos (FURTINI NETO, 1994).

Contudo, reunir em um só clone as melhores características é muito difícil, mesmo após anos de investimentos no melhoramento genético. As empresas florestais desenvolvem pesquisas voltadas à seleção de materiais genéticos adaptados às diversas condições ambientais. A avaliação de parâmetros cinéticos de absorção de nutrientes e eficiências nutricionais é fundamental para a execução desta tarefa.

Cabe ressaltar que vários mecanismos fisiológicos e morfológicos estão envolvidos no uso eficiente de nutrientes pela planta. Alguns, como o volume radicular e a relação entre a parte aérea e as raízes foram discutidos aqui. No entanto, a avaliação das taxa de fotossíntese e o gasto nutricional para a manutenção do metabolismo ainda precisam ser avaliados (FAGERIA; BALIGAR, 1998). Relacionar os dados obtidos em experimentos de cinética de absorção de nutrientes ou eficiências nutricionais com a produtividade e qualidade da madeira no momento da colheita também seria fundamental para a compreensão do mecanismo de absorção, translocação e utilização dos nutrientes.

Por fim, a eficiência nutricional pode ser afetada por fatores relacionados com o clima (temperatura, radiação solar e precipitação), com o solo (pH, teor de matéria orgânica, toxidez de alumínio, deficiências de nutrientes, salinidade, etc.) e com a planta (crescimento do sistema radicular, fixação de nitrogênio, micorrizas, alelopatia, doenças, pragas e plantas daninhas) (FAGERIA, 1998). Além disso, a eficiência nutricional obtida nessa pesquisa foi realizada com mudas de 90 dias de idade e em solução nutritiva. Para validar essas informações, faz-se necessária a

condução de estudos com plantas adultas, em diferentes solos e em distintas condições edafoclimáticas.

CONCLUSÃO

O clone I144 apresentou maior absorção de fósforo e, de um modo geral, as maiores eficiências de absorção, translocação e utilização de macronutrientes.

REFERÊNCIAS

- ABICHEQUER, A. D.; BOHNEN, H. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, n. 1, p. 21-26, 1998.
- ALCARDE, J. C.; BORELLA, J. E. Determinação do potássio em fertilizantes por fotometria de chama de emissão. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v.33, p. 751-762, 1976.
- ANGHINONI, I.; VOLKART, C. R.; FATTORE, N.; ERNANI, P. R. Morfologia de raízes e cinética da absorção de nutrientes em diversas espécies e genótipos de plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 13, n. 3, p. 355-361, 1989.
- BARBER, S. A.; WALKER, J. M.; VASEY, E.H. Mechanisms for movement of plant nutrients from soil and fertilizer to plant root. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 11, p. 204–207, 1963.
- BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L.; NOVAIS, R. F. Nutrição e adubação de eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 18, p. 70-75, 1997.
- BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L.; NOVAIS, R. F. Mineral fertilizer recommendations for eucalypt plantations. In: GONÇALVES, J.L.M., ed. **Forest nutrition and fertilization**. Piracicaba: IPEF, 2004. p.269-284.
- BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F. **Relação solo-eucalipto**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1990. 330 p.
- BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F.; CARMO, D. N.; NEVES, J. C. L. Classificação nutricional de sítios florestais: descrição de uma metodologia. **Revista Árvore**, v. 10, n. 1, p. 112-120, 1986.

BATISTA, R. O.; FURTINI NETO, A.; DECCETTI, S. F. C. Eficiência nutricional em clones de cedro-australiano. **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 107, p. 647-655, 2015.

BAYLE, V.; ARRIGI, J. F.; CREAFF, A.; NESPOULOUS, C; VIALARET, J.; ROSSIGNOL, M.; GONZALEZ, E.; PAZ-ARES, J; NUSSAUMEA, L. *Arabidopsis thaliana* High-Affinity Phosphate Transporters Exhibit Multiple Levels of Posttranslational Regulation. **Plant Cell**, v. 23, p. 1523–1535, 2011.

CLAASSEN, N.; BARBER, S. A. A method for characterizing the relation between nutrient concentration e flux into roots of intact plants. **Plant Physiology**, n. 54, p. 568, 1974.

CLARK, R. B. Characterization of phosphates of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 458-460, 1975.

CLARKSON, D. T. Factors affecting mineral nutrientes acquisition by plants. **Annual Review of Plants Physiology** , v.36, p.77-115, 1985.

CROUS, K. Y.; ÓSVALDSSON, A.; ELLSWORTH D. S. Is phosphorus limiting in a mature *Eucalyptus* woodland? Phosphorus fertilization stimulates stem growth. **Plant Soil**, v. 391, p. 293–305, 2015.

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N.; BARROS, N. F.; LEITE, H. G.; LEITE, F. P. Relação do estado nutricional de minicepas com o enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 591-599, 2009.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 2006. 403p

EPSTEIN , E.; HAGEN,C. E. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. **Plant Physiology** , v. 27, p. 457-474, 1952.

ERNANI, P. R.; SANTOS, J. C. P.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D. Prediction of phosphorus uptake by a mechanistic model in a low phosphorus highly weathered soil as affected by mycorrhizae inoculation. **Journal of Plant Nutrition**, v. 17, n. 6, p. 1067-1078, 1994.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Response of legumes and cereals to phosphorus in solution culture. **Journal of Plant Nutrition**, v. 12, n. 9, p. 1005-1019, 1989.
FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FONTES, P. C. R.; BARBER, S. A. Crescimento do sistema radicular e cinética da absorção de fósforo pelo tomateiro afetado por concentrações de fósforo na solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 10, p. 1203-1210, 1984.

FURLANI, P. R.; SILVEIRA L. C, P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIM, V. **Cultivo hidropônico de plantas**. Campinas: IAC, 1999. 52p.

FURTINI NETO, A. E. **Eficiência nutricional, cinética de absorção e frações fosfatadas em *Eucalyptus* spp.** 1994. 99 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

GERLOFF, G. C.; GABELMAN, W.H. Genetic basis of inorganic plant nutrition. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. (Eds.). **Inorganic plant nutrition**. Encyclopedia of Plant Physiology, v. 15B, Berlin: Springer- Verlag, 1983. p. 453-480.

GRESPLAN, S.L.; DIAS, L. E.;NOVAIS, R.F. Crescimento e parâmetros cinéticos de absorção de amônio e nitrato por mudas de *Eucalyptus* spp submetidas a diferentes relações amônio/nitrato na presença e ausência de fósforo. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, n. 22, v. 667-674, 1998.

HIRSCH, J.; MARIN, E.; FLORIANI, M.; CHIARENZA, S.; RICHAUD, P.; NUSSAUME, L.; THIBAUD, M. C. Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in *Arabidopsis* plants. **Biochimie**, n. 88, p. 1767–1771, 2006.

HORN, D.; ERNANI, P. R.; SANGOI, L.; SCHWEITZER, C.; CASSOL, P. C. Parâmetros cinéticos e morfológicos da absorção de nutrientes em cultivares de milho com variabilidades contrastantes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 30, p. 77-88, 2006.

IBA. 2015. Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Iba 2015**. Disponível em: <iba.org/images/shared/iba_2015.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2016.

LEE, R. B. Control of net uptake of nutrients by regulation of influx in barley plants recovering from nutrient deficiency. **Annals of Botany**, v. 72, p. 223–230, 1993.

LI, B.; McKEAND, S. E.; ALLEN, H. L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, v. 37, n. 2, p. 613-626, 1991.

LIMA, A. M. N.; NEVES, J. C. L.; SILVA, I. R. LEITE, F. P. Cinética de absorção e eficiência nutricional de K, Ca e Mg em plantas jovens de quatro clones de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 6, p. 903-909, 2005.

LÓPEZ-BUCIO, J.; MARTÍNEZ DE LA VEGA, O.; GUEVARA-GARCÍA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. **Nature Biotechnology**, n. 18, p. 450–453, 2000.

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

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic. 1995. 889 p.

MARTINEZ, H. E. P.; NOVAIS, R. F.; SACRAMENTO, L. V. S.; RODRIGUES, L. A. Comportamento de variedades de soja cultivadas sob diferentes níveis de fósforo: II., translocação do fósforo absorvido e eficiência nutricional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 17, n. 2, p. 239-244, 1993.

MENGEL, D. B.; BARBER, S. A. Rate of nutrient uptake per unit of root under field conditions. *Agronomy Journal*, v. 66, n. 3, p. 399-402, 1974.

MEURER, E. J. Potássio. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. p. 281-298.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, n. 27, p. 31-36, 1962.

NIELSEN, N. E.; BARBER, S. A. Differences among genotypes of corn in the kinetics of P uptake. **Agronomy Journal**, v. 70, n. 5, p. 695-698, 1978.

NOVAIS, R. F.; MELLO, J. W. V. Relação solo-planta. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 133-204.

PINTO, S. I. C. **Cinética de absorção conjunta de fósforo, potássio, cálcio e magnésio e eficiência nutricional de macronutrientes de clones de eucalipto**. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PINTO, S. I. C.; FURTINI NETO, A. E.; NEVES, J. C. L.; FAQUIN, V.; MORETTI, B. S. Eficiência nutricional de clones de eucalipto na fase de mudas cultivados em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 2, p. 523-533, 2011.

RENGEL, Z.; DAMON, P.M. Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. **Physiologia Plantarum**, n. 133, p. 624-636, 2008.

SANTANA, R. C.; BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L. Eficiência de utilização de nutrientes e sustentabilidade da produção em procedências de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna* em sítios florestais do Estado de São Paulo. **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 447-457, 2002.

SHEN, J.; YUAN, L.; ZHANG, J.; LI, H.; BAI, Z.; CHEN, X.; ZHANG, W.; ZHANG, F. Phosphorus dynamics: from soil to plant. **Plant Physiology**, n. 156, p. 997–1005, 2011.

SILVEIRA, R. L. V. A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; MOREIRA, A. Evaluation of the nutritional status of eucalypts: visual and foliar diagnoses and their interpretation. In: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETTI, V. **Forest nutrition and fertilization**. Piracicaba: IPEF, 2004. p. 85-111.

SINGH, S. K.; BADGUJAR, G.; REDDY, V. R.; FLEISHER, D. H.; BUNCE, J. A. Carbon dioxide diffusion across stomata and mesophyll and photo-biochemical processes as affected by growth CO₂ and phosphorus nutrition in cotton. **Journal of Plant Physiology**, n. 170, p. 801–813, 2013.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 289-302, 1981.

SWIADER, J. M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F. G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **Journal of Plant Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 1687-1699, 1994.

REIS, G. G.; REIS, M. G. F.; FONTAN, I. C. I.; MONTE, M. A.; GOMES, A. N.; OLIVEIRA, C. H. R. Crescimento de raízes e da parte aérea de clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e de *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus* spp. submetidos a dois regimes de irrigação no campo. **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, p. 921-931, 2006.

RUIZ, H. A.; FERNANDES FILHO, E. I. Cinética: software para estimar as constantes Vmax e Km da equação de Michaelis-Menten. In: **Reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas**, 10., 1992, Piracicaba, SP. Anais... Piracicaba: SBCS, 1992. p. 124-125.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS-Departamento de Solos, 1995. 174p.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. P. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, n. 157, v. 423–44, 2003.

VILELA, L.; ANGHINONI, I. Morfologia do sistema radicular e cinética de absorção de fósforo em cultivares de soja afetados pela interação alumínio- fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, n. 1, p. 91-96, 1984.

ZONTA, E.; BRASIL, F. C.; GOI, S. R.; ROSA, M. M. T. O sistema radicular e suas interações com o ambiente edáfico. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2006. p. 8-52.

CAPÍTULO 3 – Respostas fotossintéticas, metabólicas e nutricionais de clones de eucalipto cultivados com diferentes concentrações de fósforo e glyphosate

RESUMO – Em condições de deficiência de fósforo, o glyphosate pode ser transportado por transportadores de fosfato. Estudar essa interação em plantas de eucalipto é primordial, uma vez que a produtividade das florestas plantadas pode ser comprometida pela deficiência de fósforo, e o glyphosate é o herbicida mais utilizado na eucaliptocultura no controle em pós-emergência das plantas daninhas. Esta pesquisa teve como objetivo estudar as alterações fotossintéticas, metabólicas e nutricionais de plantas de *Eucalyptus urophylla* (clones GG100 e I144) cultivadas em concentrações de fósforo e submetidas à aplicação de glyphosate. Para isto, experimentos foram conduzidos em casa de vegetação (areia) e em câmara de crescimento (sistema hidropônico). Os nutrientes foram fornecidos por meio de solução nutritiva, que foi ajustada para as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X. As características fotossintéticas eficiência quântica do fotossistema II e teores de clorofilas foram reduzidas de modo mais intenso nas plantas cultivadas com menores concentrações de fósforo após a aplicação de glyphosate. Já a fotossíntese e a condutância estomática foram reduzidas apenas em função da aplicação de glyphosate. A peroxidação lipídica foi aumentada apenas após a pulverização de glyphosate. Para o clone GG100, os maiores teores de glyphosate, ácido aminometilfosfônico (AMPA) e ácido chiquímico foram quantificados após a pulverização de glyphosate nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo. Já para o clone I144, a interação só ocorreu para o teor de AMPA. Para o clone GG100 e em casa de vegetação, o menor teor de nitrogênio foi constatado para a interação entre a menor concentração de fósforo (0,5X) e na dose de glyphosate 180 g e.a. ha⁻¹. Nos experimentos em sistema hidropônico, a maior concentração de fósforo (1,5X) e a aplicação das doses das maiores doses de glyphosate reduziu os teores foliares de cálcio e magnésio para o clone GG100. Para o clone I144 redução do teor radicular de nitrogênio quando as plantas foram cultivadas com 0,5X de fósforo após a aplicação de das maiores doses de glyphosate.

Palavras-chave: *Eucalyptus urophylla*; herbicida; fotossíntese; transportadores de fosfato; ácido chiquímico; malondialdeído; nutrição.

ABSTRACT – In phosphorus deficiency conditions, glyphosate can be transported by high-affinity phosphate transporters. Studying this interaction in eucalypt plants is essential, since forests yield may be compromised by phosphorus deficiency, and glyphosate is the most widely used herbicide in eucalypt plantations to post emergence weed control. The aim of this research is to study the photosynthetic, metabolic and nutritional changes in *Eucalyptus urophylla* (GG100 and I144 clones) grown with phosphorus concentrations and submitted to glyphosate application. To this end, experiments were conducted in greenhouse (sand) and growth chamber (hydroponic system). Nutrients were provided by nutrient solution, which was adjusted to phosphorus concentrations 0.5X; 1X and 1.5X. The photosynthetic characteristics quantum efficiency of photosystem II and chlorophyll content were reduced more intensely in plants grown with lower phosphorus concentrations after glyphosate application. Photosynthesis and stomatal conductance were reduced only by glyphosate application. Lipid peroxidation was increased only after glyphosate spraying. Higher levels of glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA) and shikimic acid were quantified after glyphosate spraying in GG100 plants grown with 0.5X phosphorus. This interaction occurred only to AMPA content in I144 clone. The lowest nitrogen content was quantified to the interaction between the lowest phosphorus concentration (0.5X) and the glyphosate dose 180 g a.e. ha⁻¹ in GG100 clone growth in greenhouse. For I144 clone, only was significant interaction to root nitrogen content, which was reduced in plants grown with 0.5X phosphorus and higher glyphosate doses.

Keywords: *Eucalyptus urophylla*; herbicide; photosynthesis; phosphate transporters; shikimic acid; malondialdehyde; nutrition.

INTRODUÇÃO

O fósforo é o segundo macronutriente mais limitante ao crescimento das plantas e tem um papel importantíssimo na fotossíntese, além de ser elemento chave de várias vias metabólicas e reações bioquímicas (VERSAW; HARRISON, 2002). A disponibilidade desse nutriente na maioria dos solos, no Brasil e no mundo, raramente é adequada para o crescimento e desenvolvimento ideal das plantas (ABEL et al., 2002). A forma assimilável de fósforo pelas plantas é o ortofosfato, que é extremamente insolúvel na maioria dos solos, já que interage rapidamente com cátions e composto orgânicos (HIRSCH et al., 2006; LÓPEZ-BUCIO et al., 2000).

Assim, as plantas desenvolveram estratégias para aumentar a aquisição, a translocação e a utilização do fosfato quando se encontram em condições limitantes (RAGHOTHAMA, 1999). Uma dessas estratégias é a expressão gênica de transportadores de fosfato em função da disponibilidade desses, alterando a expressão de transportadores de baixa e alta afinidade por fosfato (LIU et al., 1998; DARAM, 1998; GUO et al., 2008; BAYKE et al., 2011).

Na literatura, existem evidências de que os transportadores de fosfato de alta afinidade, expressos em condições de deficiência de fósforo, poderiam se ligar a compostos que tivessem em sua composição fosfato, uma vez que esses teriam alta afinidade por fosfato, na tentativa de suprir a deficiência de fósforo imposta pelo sistema. Uma vez que o herbicida glyphosate apresenta um grupo fosfonato em sua molécula, poderia ser transportado pelos transportadores de fosfato de alta afinidade (DENIS; DELROT, 1993; MORIN et al., 1997; RAGHOTHAMA, 1999).

O glyphosate [N-(fosfonometil) glicina] é um dos herbicidas mais utilizados no mundo, já que é recomendado para o controle uma grande variedade de espécies vegetais anuais e perenes; possui rápida ligação às partículas do solo, rápida biodegradação e baixa toxicidade a mamíferos, aves e peixes (NEUMANN et al., 2006; PLINE-SRNIC, 2006; AHSAN et al., 2008; PRESTON; WAKELIN, 2008).

Devido ao seu amplo espectro de ação, a ocorrência de deriva de glyphosate pode promover alterações em plantas não alvo. O glyphosate atua diretamente na rota do chiquimato, inibindo a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, precursores de produtos como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos

(TAN et al., 2006; REDDY et al., 2008), que são indispensáveis para a síntese de proteínas e o crescimento das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013; NELSON, 2008). O glyphosate pode ainda afetar diretamente a fotossíntese (AHSAN et al., 2008), diminuindo a síntese de clorofila e interferindo na organização do aparelho fotossintético (MARÍA et al., 2005; AHSAN et al., 2008).

Como descrito anteriormente, em condições de deficiência de fósforo o glyphosate pode ser transportado por transportadores de fosfato de alta afinidade. Contudo, pesquisas que relacionem os efeitos do glyphosate aos teores de fósforo disponíveis e, conseqüentemente, o efeito dessa interação nas plantas, são escassas. Estudar essa interação em plantas de eucalipto é primordial, uma vez que a produtividade das florestas plantadas pode ser comprometida pela deficiência de fósforo, muito comum em solos no Brasil e no mundo; e o glyphosate é o herbicida mais utilizado na eucaliptocultura no controle em pós-emergência das plantas daninhas.

Aventa-se a hipótese de que concentrações de fósforo estejam correlacionadas à absorção e translocação de glyphosate e, conseqüentemente, aos efeitos desse herbicida nas plantas de eucalipto.

Diante do exposto, objetivou-se verificar as alterações fotossintéticas, metabólicas e nutricionais de plantas de clones de eucalipto cultivados em concentrações de fósforo e submetidas à aplicação de glyphosate.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos I e II – em casa de vegetação

Esses experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no Laboratório de Plantas Daninhas (LAPDA), anexo ao Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal-SP.

Foram utilizados dois clones, denominados GG100 (*Eucalyptus urophylla*) e I144 (um híbrido espontâneo de *E. urophylla* com uma espécie não identificada). Cada clone correspondeu a um experimento independente. Esses clones foram

escolhidos por serem muito utilizados no Estado de São Paulo e Minas Gerais e, com base em resultados prévios, esses materiais demonstraram ter diferentes capacidades de absorção de fósforo (informações disponíveis no Capítulo 2) e distintas tolerâncias a glyphosate (CARVALHO et al., 2015).

Na instalação dos experimentos, as mudas do clone GG100 tinham em média 39,0 cm de altura; 3,8 mm de diâmetro do caule e entre 14 e 18 folhas. Já as mudas do clone I144 tinham em média 32,0 cm de altura, 3,9 mm de diâmetro do caule e entre 20 e 23 folhas.

Foram utilizados como unidades experimentais vasos de plástico com capacidade para 8 litros. Esses vasos foram preenchidos com areia grossa previamente lavada, visando eliminar partículas capazes de adsorver fósforo, garantindo assim que todo fósforo fornecido às plantas estivesse livre na solução do solo e, portanto, passível de ser absorvido.

Para isto, a areia foi colocada em caixas d'água com capacidade para 100 litros, e lavada com água corrente até que a água saísse límpida. As caixas foram novamente preenchidas com água, adicionando-se ácido clorídrico (HCl - 2,5% do volume da água). Essa mistura de areia, água e HCl foi agitada manualmente e deixada por 12 horas em repouso. Após esse período, a areia foi lavada com água até a retirada do excesso de HCl e colocada sobre uma peneira fina, que permitia a passagem de água, retendo apenas os grãos de areia. Sob a peneira, mais água foi utilizada para a total retirada do HCl. Após o processo de lavagem, a areia foi seca ao ar e acondicionada nos vasos.

Para a nutrição das plantas foi utilizada a solução nutritiva de Furlani et al. (1999). As concentrações de fósforo na solução nutritiva foram ajustadas para os tratamentos 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à quantidade de fósforo recomendada para o preparo de solução original). Dessa forma, as plantas nutridas com o tratamento 0,5X receberam uma solução contendo 15,75 mg L⁻¹ ou 0,5 mmol L⁻¹ de fósforo; as plantas nutridas com 1X receberam uma solução contendo 31,5 mg L⁻¹ ou 1 mmol L⁻¹ de fósforo e as plantas nutridas com 1,5X receberam uma solução contendo 47,25 mg L⁻¹ ou 1,5 mmol L⁻¹ de fósforo (Tabela 1).

Tabela 1. Composição da solução nutritiva proposta por Furlani et al. (1999).

macronutrientes		
	mg L ⁻¹	mmol L ⁻¹
Nitrogênio	202,0	14,4
Fósforo	31,5	1,0
Potássio	193,4	4,9
Cálcio	142,5	3,6
Magnésio	39,4	1,6
Enxofre	52,3	1,6
micronutrientes		
	µg L ⁻¹	µmol L ⁻¹
Boro	262,0	24,3
Cobre	38,0	0,6
Ferro	1800,0	32,3
Manganês	369,0	6,7
Molibdênio	65,0	0,7
Zinco	144,0	1,7

As soluções nutritivas foram fornecidas inicialmente duas vezes por semana e, a partir da segunda semana após o plantio das mudas, as soluções nutritivas foram fornecidas a cada dois dias.

A irrigação dos vasos foi realizada de acordo com a umidade da areia, mensurada por meio de um medidor eletrônico de umidade do solo (Falker[®], modelo HidroFarm). Esse aparelho monitorou a umidade volumétrica da areia por meio de sensores, permitindo uma rápida identificação do teor de água disponível para as plantas e o cálculo da quantidade a ser adicionada para manter a capacidade de campo nos vasos. De acordo com informações disponíveis no manual do aparelho, a capacidade de campo ideal para um solo arenoso é de 15%. Com esse conhecimento, diariamente foram realizadas medições e, quando necessário, água destilada (GEHAKA[®], Sistema Purificador de Água) foi adicionada de modo a manter a capacidade de campo dos vasos. Sob os vasos foram colocados pratos de plástico para a coleta do excesso de água que porventura percolasse.

Aos 30 dias após o plantio, as plantas receberam os tratamentos com glyphosate nas doses 0,0; 3,6; 7,2; 18,0; 36,0; 72,0; 180,0 e 360,0 g de e. a. ha⁻¹, simulando uma deriva pulverizada com uma solução aquosa da formulação

comercial de glyphosate (Monsanto Company[®], produto comercial Scout). Essa é a formulação de glyphosate recomendada para a cultura do eucalipto.

A aplicação do herbicida foi realizada com um pulverizador costal manual pressurizado a CO₂, acoplado a uma barra de pulverização munida de um bico XR 11002. O volume de calda utilizado foi de 200 L ha⁻¹ e pressão de aplicação foi de 2 bar. A aplicação foi realizada em uma sala de pulverização livre de correntes de vento, com temperatura e umidade monitorada (26°C e 57% de umidade, respectivamente).

Para evitar qualquer contato do herbicida com a areia – garantindo assim que a absorção do glyphosate fosse unicamente foliar – foi utilizado papel alumínio para cobrir a superfície dos vasos, circulando o caule das mudas de eucalipto e isolando o substrato.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3x8, composto pelas três concentrações de fósforo e as oito doses de glyphosate.

Aos 0, 7, 21 e 35 dias após a aplicação (DAA) de glyphosate foram mensuradas a altura, o diâmetro do caule e o número de folhas.

A eficiência quântica do fotossistema II – Fv/Fm (Hansatech[®], modelo PEA) foi quantificado aos 0, 1, 3, 7 e 15 DAA. Para a medição de Fv/Fm, as folhas analisadas foram pré-adaptadas ao escuro, com a utilização de pinças por 30 minutos antes das determinações de fluorescência. Os teores relativos de clorofilas **a**, **b** e total também foram mensurados nessas avaliações (Falker[®], modelo CFL 1030).

Essas determinações (Fv/Fm e teores de clorofila) foram sempre realizadas nas mesmas folhas (previamente marcadas). A folha utilizada foi a terceira completamente expandida, contada a partir do ápice e, portanto, considerada uma folha mediana. Essas medições sempre ocorreram no período da manhã, a partir das 8 horas.

Aos 15 DAA de glyphosate, a determinação dos teores de lipoperóxidos (por meio da determinação do malondialdeído - MDA) foi realizada nas folhas das plantas submetidas à aplicação das doses de glyphosate 0,0; 7,2; 36,0; 72,0; 180,0 e 360,0 g e.a. ha⁻¹. Para isso, foram coletadas amostras foliares, congeladas imediatamente

em nitrogênio líquido e armazenadas em saquinhos de papel alumínio previamente identificados em ultrafreezer (-80 °C).

Para o teste do malondialdeído, amostras de 200 mg do material vegetal foram pesadas e maceradas em nitrogênio líquido, acrescentando-se em seguida 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%; e 20,0% de polivinilpirrolidona (PVPP). Depois da perfeita homogeneização, 1,4 mL do material foi transferido para um tubo Eppendorf e centrifugado a 10096 g por 5 minutos. Do sobrenadante originado após a centrifugação, 250 µL foram retirados e adicionou-se 1 mL de TCA a 20,0% + 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TCB) a 0,5%. Essa mistura foi mantida em banho seco a 95 °C por 30 minutos. Assim que retirados do banho-seco, os tubos foram colocados em gelo por 10 minutos e, novamente, centrifugados por 10 minutos a 10096 g.

Foram realizadas três repetições para cada amostra, lidas em espectrofotômetro em triplicatas. Duas leituras foram realizadas: uma em comprimento de onda de 535 nm e outra em 600 nm. As concentrações de MDA foram determinadas através da fórmula: $C = [\text{abs}(535-600)/155000]/10^6$.

Aos 35 DAA, as plantas de eucalipto foram separadas em raízes, caule e folhas, e essas partes das plantas foram acondicionadas em sacos de papel identificados, colocados em estufa com circulação forçada de ar para secagem, a uma temperatura de cerca de 40 °C, durante aproximadamente 120 horas. O material foi pesado para a quantificação da massa seca e triturado em micromoinho utilizando peneira de 40 mesh.

Nas amostras correspondentes aos tratamentos 0,0; 7,2; 36,0 e 180,0 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate foram determinados os teores de nitrogênio (método semi-micro-Kjeldahl) (TEDESCO et al., 1995); fósforo (método colorimétrico do metavanadato); potássio (fotometria de chama) (ALCARDE; BORELLA, 1976); cálcio; magnésio (ambos por espectrofotometria de absorção atômica) e boro (colorimetria da azometina H) (MALAVOLTA et al., 1997).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com o auxílio do programa estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2011).

Experimentos III e IV – em câmara de crescimento

Esses experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento utilizando-se sistema hidropônico no Laboratório de Plantas Daninhas (LAPDA), anexo ao Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal-SP.

Foram utilizados os mesmos clones descritos nos Experimentos I e II e cada clone correspondeu a um experimento independente. Na instalação do experimento, as mudas do clone GG100 tinham em média 29,0 cm de altura, 3,0 mm de diâmetro de caule e entre 8 e 10 folhas. Já as mudas do clone I144 tinham em média 25,0 cm de altura, 3,2 mm de diâmetro e entre 9 e 14 folhas.

As mudas foram pré-adaptadas ao sistema hidropônico por 21 dias (uso de solução nutritiva com concentrações de nutrientes crescentes: 25; 50 e 100%, e durante este período, o pH da solução foi corrigido a cada dois dias para $6,0 \pm 0,2$). No final desse período, as mudas foram selecionadas quanto a uniformidade de desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular. Cada uma das mudas selecionadas foi transferida, individualmente, para uma caixa de plástico com capacidade de 2,5 litros (15,0 x 15,0 x 10,0 cm). A nutrição das plantas também foi realizada com solução de Furlani et al. (1999) ajustada para as concentrações de fósforo 0,5X, X e 1,5 X, previamente descritas nos experimentos I e II. As condições da câmara de crescimento foram controladas (intensidade luminosa de $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; fotoperíodo de 12 horas; temperatura mantida em torno de 26 °C e umidade relativa entre 60 e 70%).

Aos 30 dias após o transplante das mudas para caixas, as plantas receberam os tratamentos com glyphosate nas quantidades 0,000; 0,017; 0,034; 0,072; 0,144; 0,288 e 0,576 g de e.a. de glyphosate em 1,6 litros de água, ou 0,000; 0,024; 0,048; 0,100; 0,200; 0,400 e 0,800 g de produto comercial em 1,6 litros de água (Monsanto Company[®], produto comercial Scout). Essas quantidades foram diluídas diretamente nas caixas de cultivo, preenchidas por 1,6 litros da solução nutritiva adequada a cada tratamento.

Doses maiores de glyphosate (doses comumente utilizadas e citadas na literatura) foram utilizadas em experimentos em sistema hidropônico previamente.

Contudo, uma vez que o glyphosate foi aplicado via solução nutritiva e a absorção foi radicular, essas doses ocasionaram a morte rápida das plantas – entre três e sete dias. Dessa forma, doses menores foram utilizadas de modo a permitir a condução do experimento por um período maior.

Assim, os tratamentos foram constituídos por três concentrações de fósforo (0,5X; 1X e 1,5X) combinadas a sete subdoses de glyphosate (0; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5 e 10%). O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com os tratamentos arranjados em esquema fatorial 3x7, com quatro repetições.

A eficiência quântica do fotossistema II – Fv/Fm (Hansatech[®], modelo PEA) e o teor relativo de clorofila total (Falker[®], modelo CFL 1030) foram mensurados as 0 (momentos antes da aplicação das subdoses de glyphosate nas caixas), 1, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 360 horas após a aplicação de glyphosate (HAA). Para a medição de Fv/Fm, a folha analisada foi pré-adaptada ao escuro, com a utilização de pinças, por 30 minutos antes das determinações de fluorescência. As taxas de fotossíntese e a condutância estomática foram determinadas as 0; 24; 48; 72; 96; 120; 144 e 168 HAA. Para isso, foi utilizado um analisador de gás por sensor infravermelho – IRGA (Li-Cor[®], modelo LI6400). Foi padronizada a taxa de radiação fotossinteticamente ativa de 522 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As análises foram realizadas nas folhas medianas. Essas determinações foram sempre realizadas nas folhas medianas (previamente marcadas em todas as plantas). Todas as medições dessas características fotossintéticas ocorreram no período da manhã, a partir das 8 horas.

Aos 15 dias após a aplicação do glyphosate, raízes, caule e folhas foram separados, identificados e acondicionados em sacos de papel em estufa com circulação forçada de ar para secagem, a uma temperatura mantida sempre inferior a 40 °C, durante cerca de 120 horas. As folhas e raízes foram trituradas em micromoinho utilizando peneira de 40 mesh.

Nas amostras de folhas e raízes correspondentes às aplicações de 0,0; 0,6; 2,5 e 10% de glyphosate foram determinados os teores de nitrogênio (método semi-micro-Kjeldahl) (TEDESCO et al., 1995); fósforo (método colorimétrico do metavanadato); potássio (fotometria de chama) (ALCARDE; BORELLA, 1976); cálcio, magnésio (ambos por espectrofotometria de absorção atômica) e boro (colorimetria da azometina H) (MALAVOLTA et al., 1997). Devido à escassez de

massa seca de folhas, a análise de boro foi realizada apenas nas raízes (colorimetria da azometina H) (MALAVOLTA et al., 1997).

As amostras de folhas correspondentes às mesmas doses de glyphosate supracitadas também foram utilizadas para determinação dos teores de glyphosate, ácido aminometilfosfônico (AMPA) e ácido chiquímico. Essas análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM) da Faculdade de Ciências Agrárias, Campus de Botucatu-SP.

O material seco moído foi pesado em balança com 0,0001g de precisão e as amostras foram acondicionadas em tubos Falcon de 15 mL de capacidade, no qual foram adicionados 10 mL de água acidificada a pH 2,5 e homogeneizado em turrax por cinco minutos. Após a extração, os tubos foram submetidos a banho com frequência ultra-sônica de 42 KHz, durante 30 minutos. Na sequência, foram centrifugados a 4000 rpm, durante 10 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro Millex HV 0,45 µm (Millipore®), com membrana durapore de 13 mm, e acondicionados em vial âmbar 9 mm, com 2 mL de capacidade.

Para a realização dessas análises foi utilizado um sistema LC-MS/MS, composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) (Shimadzu®, modelo Proeminence UFLC) equipado com duas bombas LC-20AD, auto- injetor SIL-20AC, de gaseificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Um espectrômetro de massas 3200 Q TRAP (Applied Biosystems®) foi acoplado ao HPLC. O modo utilizado nas análises foi o triplo quadrupolo, sendo que Q3 é definido para detectar apenas uma massa especial, que é um fragmento conhecido (filho) da molécula intacta (pai) de massa conhecida filtrada por Q1.

A detecção e separação dos compostos foram realizadas em duas corridas: uma para o modo negativo (18 minutos) e outra para o modo positivo (15 minutos). Cada composto possui um tempo de retenção na coluna cromatográfica, para o ácido chiquímico são necessários 3,301 minutos; para o glyphosate 3,102 minutos; e para o AMPA 3,219 minutos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com o auxílio do programa estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS

Experimento I – em casa de vegetação - clone GG100

Características fotossintéticas

O teor relativo de clorofila total do clone GG100 apresentou diferenças significativas entre concentrações de fósforo em todas as avaliações realizadas. As plantas cultivadas com 0,5X apresentaram teor relativo de clorofila total 5,1; 6,3; 5,3; 3,5 e 7,2% menor que o das plantas cultivadas com 1,5X de fósforo aos 0, 1, 3, 7 e 15 DAA, respectivamente (Tabela 2).

As doses de glyphosate ocasionaram reduções nos teores relativos de clorofila total apenas aos 7 e 15 DAA, independentemente das doses de fósforo. Aos 7 DAA, a pulverização de 360 g e.a. ha⁻¹ reduziu os teores de clorofila em 4,4%. Já aos 15 DAA das doses 36; 72; 180 e 360 g e.a. ha⁻¹, o teor relativo de clorofila total foi reduzido em 4,1; 8,5; 9,9 e 14,1%, respectivamente (Tabela 2).

Não foi constatada interação significativa entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate (Tabela 2).

Para a eficiência quântica do PSII do clone GG100, o efeito isolado das concentrações de fósforo, momentos antes da pulverização de glyphosate (0 DAA), não acarretou em diferenças significativas. Diferenças estatísticas ocorreram apenas ao 1 DAA. Nessa avaliação, a maior Fv/Fm foi quantificada em plantas cultivadas com 1,5X de fósforo. No entanto, valores iguais ou superiores a 0,750 não são considerados “indicativos de estresse”. Dessa forma, embora tenham sido constatadas diferenças estatísticas, o comprometimento do PSII iniciou-se efetivamente aos 7 DAA, e apenas nas plantas cultivadas com 0,5X (efeito isolado das concentrações de fósforo). Aos 15 DAA não foram constatadas diferenças entre

as concentrações de fósforo, mas a Fv/Fm foi reduzida em 26,0% quando comparada a Fv/Fm mensurada aos 0 DAA (Tabela 3).

Tabela 2. Teor relativo de clorofila total nas folhas do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 0, 1, 3, 7 e 15 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila total					
	0 DAA	1 DAA	3 DAA	7 DAA	15 DAA
----- unidades relativas -----					
Concentrações de fósforo					
0,5X	45,9 C ¹	45,8 B	46,0 B	46,1 C	43,3 B
1X	47,8 B	48,2 A	48,1 A	47,2 B	46,2 A
1,5X	48,4 A	48,9 A	48,6 A	47,8 A	46,7 A
Doses de glyphosate					
0,0	47,5 A	47,6 A	48,0 A	47,7 A	48,1 A
3,6	47,6 A	47,3 A	47,7 A	47,4 A	46,2 C
7,2	47,4 A	47,6 A	47,8 A	47,1 A	46,5 BC
18,0	47,2 A	47,7 A	47,5 A	47,6 A	47,6 AB
36,0	47,1 A	47,3 A	47,4 A	46,6 A	46,1 C
72,0	47,5 A	46,8 A	47,3 A	47,3 A	44,0 D
180,0	47,6 A	47,4 A	47,5 A	46,8 AB	43,3 D
360,0	47,1 A	47,7 A	47,2 A	45,6 B	41,3 E
F fósforo	127,962**	111,773**	91,041**	28,452**	135,315**
F glyphosate	1,084 ^{NS}	1,707 ^{NS}	1,465 ^{NS}	6,169**	80,344**
F fósforo x glyphosate	1,578 ^{NS}	1,1096 ^{NS}	1,346 ^{NS}	3,435 ^{NS}	1,818 ^{NS}
DMS² fósforo	0,3928	0,4413	0,4928	0,5552	0,5353
DMS² glyphosate	0,8367	0,9400	1,0497	2,1827	1,1402
CV³ (%)	2,38	1,52	1,73	3,97	2,07

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A pulverização de glyphosate sobre as folhas das plantas de eucalipto ocasionou reduções na Fv/Fm ao 1 DAA. A dose 360 g e.a. ha⁻¹ reduziu a eficiência quântica em 11,5%. Essa mesma dose ocasionou redução na Fv/Fm de 36,5% aos 3 e 7 DAA. Aos 15 DAA doses inferiores a 72 g e.a. ha⁻¹ não alteraram o funcionamento no aparato fotossintético. Contudo, as doses 180 e 360 g e.a. ha⁻¹

promoveram desidratação das folhas impossibilitando a mensuração da Fv/Fm (Tabela 3).

Tabela 3. Eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) nas folhas do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 0, 1, 3, 7 e 15 dias após a aplicação (DAA) de doses de glyphosate.

Eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm)					
	0 DAA	1 DAA	3 DAA	7 DAA	15 DAA
Concentrações de fósforo					
0,5X	0,830 A ¹	0,793 B	0,718 A	0,718 A	0,614 A
1X	0,821 A	0,797 B	0,775 A	0,718 A	0,615 A
1,5X	0,819 A	0,811 A	0,780 A	0,722 A	0,614 A
Doses de glyphosate					
0,0	0,820 A	0,821 A	0,820 A	0,820 A	0,817 B
3,6	0,821 A	0,819 A	0,819 A	0,821 A	0,825 A
7,2	0,820 A	0,820 A	0,814 A	0,817 A	0,816 B
18,0	0,819 A	0,821 A	0,821 A	0,818 A	0,821 AB
36,0	0,822 A	0,816 A	0,728 A	0,760 A	0,816 B
72,0	0,819 A	0,810 A	0,770 A	0,790 A	0,821 AB
180,0	0,818 A	0,769 B	0,701 AB	0,455 AB	0,000 C
360,0	0,822 A	0,726 C	0,521 B	0,350 B	0,000 C
F fósforo	0,318 ^{NS}	12,804 ^{**}	3,339 ^{NS}	80,690 ^{NS}	0,450 ^{NS}
F glyphosate	0,562 ^{NS}	60,746 ^{**}	7,138 ^{**}	1730,626 ^{**}	7632,090 ^{**}
F fósforo x glyphosate	1,790 ^{NS}	5,907 ^{**}	1,391 ^{NS}	24,409 ^{NS}	1,528 [*]
DMS² fósforo	0,0035	0,0091	0,0640	0,0114	0,0028
DMS² glyphosate	0,0075	0,0195	0,1364	0,0244	0,0060
CV³ (%)	0,73	1,92	4,12	2,75	0,77

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. ^{*}Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{**}Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Interações entre fósforo e glyphosate foram constatadas aos 1 e 15 DAA (Tabela 3). Nessas interações foi possível notar que quanto maior a concentração de fósforo oferecida às plantas, menor a redução da eficiência do PSII para uma mesma dose de glyphosate. Ao 1 DAA, as maiores Fv/Fm foram mensuradas nas plantas pulverizadas com doses até 72 g e.a. ha⁻¹, independentemente da concentração de fósforo. Já as menores Fv/Fm foram quantificadas após a aplicação de 360 g e.a. ha⁻¹, e nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo. Aos 15 DAA, a

Fv/Fm foi aproximadamente 16,0% menor nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo, quando comparada as cultivadas com 1X e 1,5X, após a pulverização de 72 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate (Tabela 4).

Após 15 dias da pulverização de 180 e 360 g e.a. ha⁻¹, o rendimento quântico máximo do PSII foi reduzido em 17,1 e 49,7% nas plantas cultivadas com 0,5X quando comparadas aquelas cultivadas com 1,5X, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre a eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) nas folhas do clone GG100 aos 1 e 15 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

Eficiência quântica do fotossistema II ao 1 DAA								
	0,0	3,6	7,2	18,0	36,0	72,0	180,0	360,0
0,5X	0,824 Aa ¹	0,817 Aa	0,818 Aa	0,819 Aa	0,814 Aa	0,794 Aa	0,738 Cb	0,688 Cb
1X	0,822 Aa	0,821 Aa	0,826 Aa	0,818 Aa	0,816 Aa	0,820 Aa	0,765 Bab	0,720 Bb
1,5X	0,818 Aa	0,818 Aa	0,817 Aa	0,825 Aa	0,818 Aa	0,818 Aa	0,805 Ab	0,772 Ac
Eficiência quântica do fotossistema II aos 15 DAA								
	0,0	3,6	7,2	18,0	36,0	72,0	180,0	360,0
0,5X	0,816 Aa	0,805 Aa	0,822 Aa	0,824 Aa	0,743 Bb	0,666 Bc	0,542 Cd	0,099 Be
1X	0,818 Aa	0,817 Aa	0,825 Aa	0,824 Aa	0,822 Aa	0,815 Aa	0,590 Bb	0,284 Ac
1,5X	0,821 Aa	0,821 Aa	0,821 Aa	0,820 Aa	0,813 Aa	0,795 Aa	0,654 Ab	0,197 Ac

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Teores de lipoperóxidos

Diferenças nos teores de MDA não foram significativas entre as concentrações de fósforo para o clone GG100. Já entre as doses de glyphosate, os maiores teores de MDA foram quantificados apenas após a pulverização de 360 g e.a. ha⁻¹, alcançando valores até 32,1% maiores que a testemunha sem aplicação do herbicida (Tabela 5).

A interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate não foi significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Teor de malondialdeído nas folhas do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 15 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

Teor de MDA	
----- nmol g ⁻¹ de tecido foliar fresco -----	
Concentrações de fósforo	
0,5X	5,98 A ¹
1X	5,17 A
1,5X	5,34 A
Doses de glyphosate	
0,0	4,20 B
7,2	4,42 B
36,0	4,49 B
72,0	4,84 B
180,0	4,80 B
360,0	6,19 A
F fósforo	2,154 ^{NS}
F glyphosate	12,539**
F fósforo x glyphosate	1,467 ^{NS}
DMS² fósforo	0,2717
DMS glyphosate	0,9025
CV³ (%)	5,06

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias.

³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Nutrição

Diferenças entre as concentrações de fósforo foram observadas para os teores foliares de todos os nutrientes, com exceção do magnésio (Mg). O maior teor de nitrogênio (N) foi quantificado nas plantas cultivadas com 1X de fósforo. Já os teores de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e boro (B) foram 47,1; 19,2; 10,7 e 27,0% menores na dose de 0,5X, respectivamente, quando comparados aos teores das plantas cultivadas com as demais doses de fósforo (1X e 1,5X) (Tabela 6).

O efeito isolado das doses de glyphosate foi constatado somente no teor foliar de N (Tabela 6).

Tabela 6. Teores foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e boro (B) no clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 35 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

Teores nutricionais foliares						
	N	P	K	Ca	Mg	B
	----- g kg ⁻¹ -----					mg kg ⁻¹
Concentrações de fósforo						
0,5X	13,65 C ¹	0,84 B	8,97 B	9,13 B	3,22 A	31,14 B
1X	24,35 A	1,59 A	11,11 A	10,23 A	3,34 A	42,68 A
1,5X	22,35 B	1,55 A	11,17 A	10,18 A	3,38 A	40,82 A
Doses de glyphosate						
0,0	20,97 A	1,30 A	10,41 A	10,25 A	3,29 A	38,70 A
7,2	20,39 AB	1,30 A	10,40 A	10,11 A	3,47 A	39,31 A
36,0	20,02 AB	1,31 A	10,42 A	9,45 A	3,25 A	37,27 A
180,0	19,08 B	1,46 A	10,39 A	9,44 A	3,24 A	37,58 A
F fósforo	329,531**	112,514**	63,562**	5,340*	0,961 ^{NS}	126,106**
F glyphosate	4,823*	2,988 ^{NS}	0,002 ^{NS}	2,092 ^{NS}	1,157 ^{NS}	2,234 ^{NS}
F fósforo x glyphosate	1,282*	1,197 ^{NS}	0,600 ^{NS}	2,385 ^{NS}	1,707 ^{NS}	3,182 ^{NS}
DMS² fósforo	1,1832	0,1536	0,5933	0,9764	0,3268	2,0829
DMS² glyphosate	1,5202	0,1974	0,7623	1,2545	0,4198	2,6761
CV³ (%)	4,41	8,55	4,27	7,45	7,38	4,08

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Interações entre fósforo e glyphosate foram constatadas apenas para o teor de nitrogênio (Tabela 6). Os maiores teores foliares de N foram quantificados nas plantas cultivadas com 0,5 e 1X de fósforo após a pulverização de 0; 7,2 e 36 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate. Os menores teores de N foram quantificados nas folhas das plantas cultivadas com 0,5X de fósforo. O menor teor de N foi constatado após a pulverização de 180 g e.a. ha⁻¹ nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo (Tabela 7).

Tabela 7. Desdobramento da interação entre as concentrações de fósforo e as doses de glyphosate sobre os teores foliares de nitrogênio do clone GG100 aos 35 dias após a aplicação das doses de glyphosate.

	Teor de nitrogênio (g kg ⁻¹)			
	0,0	7,2	36,0	180,0
0,5X	13,73 Ba ¹	14,05 Ba	13,74 Ba	13,07 Bb
1X	25,14 Aa	24,47 Aa	24,94 Aa	22,86 Ab
1,5X	24,05 Aa	22,64 Aa	21,39 Aa	21,30 Aa

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Já nas raízes, apenas os teores de N, P e Mg apresentaram diferenças estatísticas diante do uso de diferentes concentrações de fósforo (Tabela 8).

Tabela 8. Teores radiculares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e boro (B) do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 35 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

	Teores nutricionais radiculares					
	N	P	K	Ca	Mg	B
	----- g kg ⁻¹ -----					
Concentrações de fósforo						
0,5X	5,26 B ¹	0,43 B	5,39 A	3,81 A	1,16 B	17,52 A
1X	5,91 A	0,54 A	4,99 A	3,80 A	1,55 A	18,62 A
1,5X	5,92 A	0,56 A	5,17 A	3,94 A	1,39 A	18,78 A
Doses de glyphosate						
0,0	5,62 A	0,56 A	4,95 A	3,85 A	1,25 A	18,58 A
7,2	5,76 A	0,55 A	5,52 A	4,01 A	1,32 A	17,88 A
36,0	5,70 A	0,53 A	5,31 A	4,13 A	1,37 A	18,61 A
180,0	5,66 A	0,46 A	4,97 A	3,41 A	1,39 A	18,16 A
F fósforo	18,370**	6,270*	0,401 ^{NS}	0,247 ^{NS}	9,936**	2,348 ^{NS}
F glyphosate	0,439 ^{NS}	2,389 ^{NS}	0,569 ^{NS}	3,069 ^{NS}	0,698 ^{NS}	0,468 ^{NS}
F fósforo x glyphosate	1,100 ^{NS}	1,017 ^{NS}	1,998 ^{NS}	5,321 ^{NS}	0,665 ^{NS}	0,788 ^{NS}
DMS² fósforo	0,3334	0,0973	1,1946	0,5828	0,2391	1,6928
DMS glyphosate	0,4284	0,1250	1,5348	0,7488	0,3072	2,1749
CV³ (%)	4,38	13,81	7,24	11,33	13,40	6,93

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Os menores teores de N, P e Mg foram quantificados nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo e foram, respectivamente, 11,1; 23,2 e 16,5% inferiores quando comparados às plantas cultivadas com 1,5X de fósforo. As doses de glyphosate não alteraram significativamente os teores nutricionais radiculares, e interações entre fósforo e glyphosate não foram constatadas para nenhum nutriente (Tabela 8).

Crescimento

Momentos antes da aplicação de glyphosate (0 DAA), houve diferença significativa apenas entre as concentrações de fósforo (Tabela 9).

Nessa avaliação, as plantas cultivadas com 0,5X de fósforo apresentaram altura 0,6 e 4,0% menores que as cultivadas com 1X e 1,5X, respectivamente. Aos 7 e 21 DAA a diferença entre as concentrações de fósforo também resultaram em um crescimento em altura cerca de 4,0% menor nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo. No entanto, aos 35 DAA os efeitos das concentrações de fósforo sobre a altura das plantas não foram mais constatados. Após a pulverização de glyphosate, as maiores reduções na altura das plantas ocorreram a partir dos 21 DAA. Nessa avaliação, a pulverização das doses 180 e 360 g e.a. ha⁻¹ restringiram o crescimento em altura das plantas em 7,6 e 13,7%, respectivamente. Essas mesmas doses ocasionaram reduções de 16,8 e 32,3%, respectivamente, na altura das plantas aos 35 DAA. Ainda aos 21 DAA, foi constatado incremento de 7,5% na altura das plantas após a pulverização de 36 g e.a. ha⁻¹ (Tabela 9).

Não foram constatadas interações entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre a altura das plantas (Tabela 9).

O diâmetro do caule do clone GG100 foi influenciado pelas concentrações de fósforo: aos 0, 7 e 21 DAA o diâmetro do caule foi cerca de 7,0% menor nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo quando comparado as plantas cultivadas com 1X e 1,5X (Tabela 10).

Tabela 9. Altura do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 0, 7, 21 e 35 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

	Altura			
	0 DAA	7 DAA	21 DAA	35 DAA
	----- cm -----			
Concentrações de fósforo				
0,5X	40,95 B ¹	42,29 B	46,20 B	51,01 A
1X	41,20 A	44,35 A	48,15 A	50,78 A
1,5X	42,67 A	44,26 A	46,60 AB	51,48 A
Doses de glyphosate				
0,0	41,33 A	43,76 A	46,65 B	52,08 A
3,6	40,67 A	44,50 A	48,00 AB	54,04 A
7,2	40,95 A	44,45 A	49,62 AB	55,09 A
18,0	41,04 A	44,58 A	49,00 AB	54,66 A
36,0	41,04 A	44,33 A	50,16 A	55,25 A
72,0	40,83 A	44,20 A	49,12 AB	55,08 A
180,0	40,91 A	42,12 AB	43,08 C	43,29 B
360,0	40,75 A	41,12 B	40,25 C	35,25 C
F fósforo	4,278 ^{**}	6,883 ^{**}	4,765 ^{**}	0,426 ^{NS}
F glyphosate	0,063 ^{NS}	3,207 ^{**}	21,218 ^{**}	48,577 ^{**}
F fósforo x glyphosate	0,354 ^{NS}	1,286 ^{NS}	0,230 ^{NS}	0,436 ^{NS}
DMS² fósforo	0,2059	1,4991	1,5909	1,8564
DMS² glyphosate	3,6335	3,1991	3,3886	3,9541
CV³ (%)	6,96	5,74	5,66	6,07

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Observando-se o efeito isolado das doses de glyphosate, a pulverização de 360 g ha⁻¹ reduziu o diâmetro do caule em 5,7; 7,4 e 16,5%, aos 7, 21 e 35 DAA, respectivamente, quando comparada à testemunha. Também foi constatado o aumento do diâmetro do caule após a pulverização de 36 g e.a. ha⁻¹. Não foram constatadas interações entre fósforo e glyphosate sobre o diâmetro do caule das plantas do clone GG100 (Tabela 10).

O número de folhas foi alterado pelas concentrações de fósforo antes mesmo da pulverização de glyphosate (0 DAA). Nessa avaliação inicial, as plantas cultivadas com 0,5X de fósforo apresentaram um número de folhas 13,8% menor

que as plantas cultivadas com a dose de fósforo 1X. Já aos 21 DAA o maior número de folhas foi quantificado nas plantas cultivadas com 1X de fósforo. Aos 35 DAA, as plantas cultivadas com 0,5X de fósforo apresentaram um número de folhas cerca de 7,0% menor que as cultivadas com 1X e 1,5X (Tabela 11).

Tabela 10. Diâmetro do caule do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 0, 7, 21 e 35 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

	Diâmetro do caule			
	0 DAA	7 DAA	21 DAA	35 DAA
	----- mm -----			
Concentrações de fósforo				
0,5X	3,87 B ¹	4,38 B	4,96 B	5,77 A
1X	4,10 A	4,71 A	5,32 A	5,62 A
1,5X	4,16 A	4,63 A	5,30 A	5,58 A
Doses de glyphosate				
0,0	3,82 A	4,32 AB	4,86 ABC	5,69 AB
3,6	3,96 A	4,56 A	4,99 ABC	5,72 AB
7,2	3,79 A	4,57 A	5,20 AB	5,77 AB
18,0	3,87 A	4,69 A	5,05 ABC	5,90 AB
36,0	3,87 A	4,67 A	5,41 A	6,09 A
72,0	4,00 A	4,61 A	5,00 ABC	5,90 AB
180,0	3,85 A	4,30 AB	4,73 BC	5,45 B
360,0	3,90 A	4,07 B	4,50 C	4,75 C
F fósforo	3,627*	9,335*	3,477*	1,698 ^{NS}
F glyphosate	0,436 ^{NS}	3,964**	4,506**	10,565**
F fósforo x glyphosate	0,807 ^{NS}	0,625 ^{NS}	0,710 ^{NS}	0,408 ^{NS}
DMS² fósforo	0,2224	0,2254	0,2726	0,2626
DMS² glyphosate	0,4737	0,4802	0,5806	0,5594
CV³ (%)	9,57	8,41	9,16	7,75

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

O efeito isolado das doses de glyphosate reduziu o número de folhas das plantas do clone GG100 e essa redução aumentou ao longo das avaliações. Aos 7 DAA, a aplicação de 360 g e.a. ha⁻¹ reduziu o número de folhas em 51,5%. Já aos 21 DAA, as doses de 180 e 360 g e.a. ha⁻¹ reduziram essa variável em 52,3 e 73,0%,

respectivamente. Aos 35 DAA, essas mesmas doses de glyphosate reduziram o número de folhas em 73,0 e 80,7%, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11. Número de folhas do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 0, 7, 21 e 35 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

	Número de folhas			
	0 DAA	7 DAA	21 DAA	35 DAA
Concentrações de fósforo				
0,5X	21,84 B ¹	28,40 A	35,68 B	42,96 B
1X	25,34 A	30,21 A	38,34 A	45,75 A
1,5X	23,87 A	30,46 A	34,71 B	46,68 A
Doses de glyphosate				
0,0	24,58 A	29,0 B	41,08 A	50,25 A
3,6	24,33 A	33,25 AB	41,16 A	51,41 A
7,2	25,25 A	33,83 AB	44,66 A	56,33 A
18,0	24,83 A	33,08 AB	44,17 A	56,25 A
36,0	25,08 A	33,75 AB	44,83 A	56,16 A
72,0	24,66 A	35,77 A	43,41 A	45,08 A
180,0	24,75 A	24,75 BC	19,58 B	16,91 B
360,0	24,90 A	14,16 C	11,08 C	9,66 C
F fósforo	2,398 [*]	1,963 ^{NS}	7,119 ^{**}	3,808 [*]
F glyphosate	0,8072 ^{NS}	29,921 ^{**}	131,789 ^{**}	114,748 ^{**}
F fósforo x glyphosate	0,9524 ^{NS}	0,724 ^{NS}	1,678 ^{NS}	3,503 ^{NS}
DMS² fósforo	1,5591	2,7194	2,3812	3,3552
DMS² glyphosate	4,6840	5,7927	5,0720	7,1465
CV³ (%)	14,28	15,30	10,98	12,42

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. ^{*}Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{**}Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Não foram constatadas interações entre as concentrações de fósforo e as doses de glyphosate (Tabela 11).

O maior acúmulo de massa seca de folhas e de caule foi constatado nas plantas cultivadas com a maior concentração de fósforo. Nesta condição de crescimento (1,5X de fósforo), as massas secas de folhas e de caule foram, respectivamente, 8,6 e 11,7% maiores quando comparadas as plantas cultivadas

com 0,5X de fósforo. Já a massa seca de raízes foi estatisticamente maior nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo, e esse incremento foi de 1,7% (Tabela 12).

Tabela 12. Massas secas das folhas (MSF), caule (MSC) e raízes (MSR) do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 35 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

Massas secas			
	MSF	MSC	MSR
	----- gramas -----		
Concentrações de fósforo			
0,5X	6,14 B ¹	4,20 B	12,08 A
1X	6,30 B	4,22 B	11,84 B
1,5X	6,67 A	4,69 A	11,87 B
Doses de glyphosate			
0,0	7,27 A	4,49 B	12,89 A
3,6	7,46 A	4,72 AB	12,85 A
7,2	7,42 A	4,73 AB	13,26 A
18,0	7,29 A	4,93 A	12,77 A
36,0	7,37 A	4,87 AB	12,70 A
72,0	7,43 A	4,77 AB	13,97 A
180,0	4,04 B	3,86 C	11,09 B
360,0	2,70 C	2,58 D	9,10 C
F fósforo	0,983**	5,403**	9,018**
F glyphosate	0,644**	6,913**	6,156**
F fósforo x glyphosate	0,041*	3,406**	2,444 ^{NS}
DMS² fósforo	0,3067	0,2036	0,5160
DMS² glyphosate	0,6534	0,4310	1,0992
CV³ (%)	8,04	7,73	7,02

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Após a aplicação dessas doses, a massa seca de folhas foi reduzida em 44,4 e 62,8%, respectivamente, quando comparadas a testemunha (0 g e.a. ha⁻¹). Para massa seca de caule essas reduções foram de 14,3 e 42,5%, respectivamente. Já a massa seca de raízes foi reduzida em 13,9 e 29,2%, respectivamente, diante da pulverização foliar de 180 e 360 g e.a. ha⁻¹. Ainda para a massa seca de caule, foi

notado incremento significativo de 9,8% após a pulverização de 18 g e.a. ha⁻¹ (Tabela 12).

Interações entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate foram constatadas para as massas secas das folhas e de caule (Tabela 12).

O desdobramento dessas interações indicou que os maiores acúmulos de massa seca foram quantificados nas plantas que receberam a pulverização de doses de glyphosate entre 0 e 72 g e.a. ha⁻¹, independentemente da concentração de fósforo utilizada. Após a pulverização de 360 g e.a. ha⁻¹, a massa seca de folhas das plantas cultivadas com 0,5X de fósforo foi 38,2% menor que a massa seca das plantas cultivadas com 1,5X de fósforo. Para a massa seca de caule, essa diferença foi de 11,6% (Tabela 13).

Tabela 13. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre a massa seca de folhas e caule das plantas do clone GG100 aos 35 dias após a aplicação das doses de glyphosate.

Massa seca de folhas (gramas)								
	0,0	3,6	7,2	18,0	36,0	72,0	180,0	360,0
0,5X	7,11 Aa ¹	7,20 Aa	7,20 Aa	6,96 Aa	7,23 Aa	7,25 Aa	3,98 Ab	2,10 Bc
1X	7,09 Aa	7,52 Aa	7,39 Aa	7,23 Aa	7,22 Aa	7,43 Aa	3,96 Ab	2,59 ABb
1,5X	7,60 Aa	7,67 Aa	7,66 Aa	7,67 Aa	7,57 Aa	7,61 Aa	4,19 Ab	3,40 Ac
Massa seca de caule (gramas)								
	0,0	3,6	7,2	18,0	36,0	72,0	180,0	360,0
0,5X	4,22 Aa	4,43 Aa	4,46 Aa	4,54 Aa	4,47 Aa	4,63 Aa	3,68 Bb	2,57 Bc
1X	4,51 Aa	4,53 Aa	4,48 Aa	5,51 Aa	4,61 Aa	4,51 Aa	3,90 Ab	2,57 Bc
1,5X	4,53 Aa	5,10 Aa	5,23 Aa	5,74 Aa	5,51 Aa	5,17 Aa	4,01 Aa	2,91 Ab

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Experimento II – em casa de vegetação - clone I144

Características fotossintéticas

O teor relativo de clorofila total apresentou diferenças significativas entre as concentrações de fósforo aos 3, 7 e 15 DAA e entre as doses de glyphosate em todas as avaliações a partir de 1 DAA (Tabela 14).

Tabela 14. Teor relativo de clorofila total nas folhas do clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 0, 1, 3, 7 e 15 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila total					
	0 DAA	1 DAA	3 DAA	7 DAA	15 DAA
----- unidades relativas -----					
Concentrações de fósforo					
0,5X	48,60 A ¹	48,54 A	47,74 B	47,66 B	45,23 B
1X	48,90 A	48,87 A	48,98 A	48,93 A	48,50 A
1,5X	48,70 A	49,30 A	48,72 A	48,59 A	48,00 A
Doses de glyphosate					
0,0	49,33 A	50,19 A	49,82 A	48,95 AB	49,43 A
3,6	49,01 A	49,92 A	48,35 C	47,53 BC	47,37 BC
7,2	49,80 A	50,01 A	49,60 AB	47,54 C	47,32 BCD
18,0	49,55 A	48,77 B	48,53 BC	48,45 BC	48,92 AB
36,0	48,50 A	48,97 B	47,68 C	47,60 C	46,15 CD
72,0	48,98 A	47,70 B	47,97 C	49,80 A	47,37 BC
180,0	49,13 A	47,27 B	47,67 C	48,38 BC	45,68 D
360,0	49,73 A	47,53 B	48,21 C	48,01 BC	45,70 D
F fósforo	0,822 ^{NS}	0,974 ^{NS}	18,406 ^{**}	16,547 ^{**}	58,337 ^{**}
F glyphosate	2,871 ^{NS}	29,164 ^{**}	10,826 ^{**}	9,575 ^{**}	13,721 ^{**}
F fósforo x glyphosate	4,490 ^{NS}	5,407 ^{**}	0,926 ^{NS}	1,364 ^{NS}	2,294 [*]
DMS² fósforo	0,5273	0,4145	0,5145	0,4954	0,7811
DMS_{glyphosate}	1,1920	0,8832	1,0958	1,0534	1,6639
CV³ (%)	1,50	1,42	1,77	1,71	2,76

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. ^{*}Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{**}Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Observando-se o efeito isolado das concentrações de fósforo foi possível constatar que o teor relativo de clorofila total foi menor nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo aos 3, 7 e 15 DAA, e essas reduções foram de 2,5; 2,5 e 6,7%, respectivamente, em relação às plantas cultivadas com 1X de fósforo.

Já o efeito isolado das doses de glyphosate ocasionou redução no teor de clorofila total a partir de 1 DAA e, de modo geral, as maiores reduções foram constatadas diante da aplicação das maiores doses de glyphosate. Aos 15 DAA, a pulverização foliar de 180 e 360 g e.a. ha⁻¹ reduziu os teores relativos de clorofila total em 7,5% (Tabela 14).

A interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate foi significativa aos 1 e 15 DAA (Tabela 14). Ao 1 DAA, os menores teores relativos de clorofila total foram mensurados nas plantas cultivadas com as menores concentrações de fósforo já a partir da pulverização de 18 g e.a. ha⁻¹. Ainda nessa avaliação, as plantas cultivadas com 1X ou 1,5X não apresentaram reduções significativas nos teores de clorofila total, independentemente da dose de glyphosate pulverizada. Aos 15 DAA, o teor de clorofila total foi reduzido em 13,2% nas plantas cultivadas com 0,5X; em 3,47% nas cultivadas com 1X e em 5,9% nas cultivadas com 1,5X (comparando-se a pulverização de 0,0 e 360 g e.a. ha⁻¹) (Tabela 15).

Tabela 15. Desdobramento da interação entre fósforo e glyphosate sobre o teor relativo de clorofila total nas folhas do clone GG100 aos 1 e 15 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila (unidades relativas) total ao 1 DAA								
	0,0	3,6	7,2	18,0	36,0	72,0	180,0	360,0
0,5X	50,43 Aa ¹	49,90 Aa	50,63 Aa	47,93 Ba	48,33 Ba	46,40 Bb	47,03 Ab	47,70 Bb
1X	50,23 Aa	49,83 Aa	49,76 Aa	48,40 Aa	48,00 Aa	48,50 Aa	47,36 Aa	48,93 Aa
1,5X	49,93 Aa	50,03 Aa	49,60 Aa	50,00 Aa	50,26 Aa	48,20 Aa	47,43 Aa	48,96 Aa
Teor relativo de clorofila total (unidades relativas) aos 15 DAA								
	0,0	3,6	7,2	18,0	36,0	72,0	180,0	360,0
0,5X	49,53 Aa	45,50 Bbc	45,10 Bbc	46,9 Bab	44,06 Bbc	44,10 Bbc	43,60 Bbc	42,96 Cc
1X	50,10 Aa	48,31 Aa	48,5 Aa	50,23 Aa	47,00 Aa	48,86 Aa	46,66 Aa	48,36 Aa
1,5X	48,66 Aa	48,32 Aa	48,3 Aa	49,60 Aa	47,40 Aab	49,16 Aa	46,80 Aab	45,76 Bb

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

A eficiência quântica do PS II (Fv/Fm), antes da aplicação de glyphosate, não apresentou diferenças estatísticas entre concentrações de fósforo ou doses de glyphosate. Diferenças significativas na Fv/Fm foram observadas entre as concentrações de fósforo aos 1, 7 e 15 DAA, e os menores valores foram

mensurados nas plantas cultivadas com menores concentrações de fósforo (Tabela 16).

Tabela 16. Eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) nas folhas do clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 0, 1, 3, 7 e 15 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

Eficiência quântica do fotossistema II					
	0 DAA	1 DAA	3 DAA	7 DAA	15 DAA
Concentrações de fósforo					
0,5X	0,820 A ¹	0,798 B	0,777 A	0,660 B	0,599 B
1X	0,821 A	0,817 A	0,779 A	0,660 B	0,616 A
1,5X	0,825 A	0,809 A	0,798 A	0,707 A	0,614 A
Doses de glyphosate					
0,0	0,820 A	0,822 A	0,821 A	0,820 A	0,819 A
3,6	0,820 A	0,821 A	0,819 A	0,819 A	0,821 A
7,2	0,821 A	0,822 A	0,758 BC	0,812 AB	0,821 A
18,0	0,821 A	0,822 A	0,823 A	0,813 AB	0,819 A
36,0	0,818 A	0,821 A	0,822 A	0,790 B	0,808 B
72,0	0,819 A	0,800 BC	0,765 B	0,717 C	0,787 C
180,0	0,821 A	0,794 C	0,750 BC	0,529 D	0,00 D
360,0	0,819 A	0,764 D	0,719 C	0,108 E	0,00 D
F fósforo	0,021 ^{NS}	13,106**	1,269 ^{NS}	61,366**	39,213**
F glyphosate	0,485 ^{NS}	24,060**	6,247**	2033,604**	2096,500**
F fósforo x glyphosate	0,859 ^{NS}	3,869**	3,000**	17,037**	23,311**
DMS² fósforo	0,0030	0,0089	0,0342	0,0114	0,0048
DMS² glyphosate	0,0065	0,0189	0,0729	0,0244	0,0102
CV³ (%)	1,62	1,84	7,29	2,84	1,32

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

No entanto, como já apresentado anteriormente, valores de Fv/Fm superiores a 0,750 não são indicativos de comprometimento do aparato fotossintético. Sendo assim, sinais de comprometimento parcial do rendimento do PSII iniciaram-se aos 7 DAA. A Fv/Fm das plantas cultivadas com 1,5X de fósforo foi 7,1% maior quando comparada a das plantas cultivadas com 0,5X e 1X de fósforo. Já aos 15 DAA essa diferença foi de 2,6% (Tabela 16).

As doses de glyphosate ocasionaram reduções indicativas de comprometimento no rendimento do PSII aos 3 DAA. Nessa avaliação, a aplicação de 360 g e.a. ha⁻¹ ocasionou redução de 12,4%. Já aos 7 DAA, com as doses de 180 e 360 g e.a. ha⁻¹ a Fv/Fm foi reduzida em 35,4 e 86,8%. Aos 15 DAA essas doses ocasionaram 100,0% de comprometimento do aparato fotossintético, uma vez que devido à desidratação das folhas, nenhuma atividade foi quantificada (Tabela 16).

Interações entre fósforo e glyphosate foram significativas a partir dos 3 DAA (Tabela 16). Por meio do desdobramento destas interações, foi possível notar o comprometimento do PSII apenas nas plantas cultivadas com as menores concentrações de fósforo após a pulverização das maiores doses de glyphosate (Tabela 17).

Aos 7 DAA a Fv/Fm em plantas cultivadas com 0,5X de fósforo foi 10,4% menor quando comparadas as plantas cultivadas com 1,5X de fósforo, respectivamente, após a pulverização de 72 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate. Após a aplicação das doses 180 e 360 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate essas reduções foram de 31,0 e 27,6%, respectivamente.

Ainda aos 15 DAA de 72 g e.a. ha⁻¹ as plantas cultivadas com 1X e 1,5X apresentaram funcionamento normal do PSII, enquanto as plantas cultivadas com 0,5X de fósforo apresentaram redução de 11,0% na Fv/Fm. Nessa avaliação final não foi mais possível quantificar a Fv/Fm devido ao alto grau de desidratação das folhas pulverizadas com 180 e 360 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate (Tabela 17).

Tabela 17. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses glyphosate sobre a eficiência quântica do fotossistema II nas folhas do clone I144 aos 1, 3, 7 e 15 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

Eficiência quântica do fotossistema II ao 1 DAA								
	0,0	3,6	7,2	18,0	36,0	72,0	180,0	360,0
0,5X	0,820 Aa ¹	0,817 Aa	0,823 Aa	0,822 Aa	0,823 Aa	0,768 Bb	0,775 Bb	0,740 Bc
1X	0,822 Aa	0,818 Aa	0,820 Aa	0,823 Aa	0,822 Aa	0,824 Aa	0,803 Ab	0,801 Ab
1,5X	0,826 Aa	0,821 Aa	0,823 Aa	0,823 Aa	0,820 Aa	0,810 Aa	0,806 Aa	0,791 Ab
Eficiência quântica do fotossistema II aos 3 DAA								
	0,0	3,6	7,2	18,0	36,0	72,0	180,0	360,0
0,5X	0,821 Aa	0,818 Aa	0,823 Aa	0,821 Aa	0,823 Aa	0,745 Bab	0,712 Bb	0,658 Bb
1X	0,824 Aa	0,819 Aa	0,815 Aa	0,823 Aa	0,820 Aa	0,821 Aa	0,748 Ab	0,743 Ab
1,5X	0,820 Aa	0,819 Aa	0,818 Aa	0,827 Aa	0,823 Aa	0,821 Aa	0,791 Aa	0,757 Ab
Eficiência quântica do fotossistema II aos 7 DAA								
	0,0	3,6	7,2	18,0	36,0	72,0	180,0	360,0
0,5X	0,822 Aa	0,822 Aa	0,808 Aa	0,805 Aa	0,773 Bb	0,706 Bc	0,449 Cd	0,097 Be
1X	0,817 Aa	0,817 Aa	0,811 Aa	0,816 Aa	0,789 ABa	0,659 Ba	0,486 Bb	0,095 Bc
1,5X	0,822 Aa	0,818 Aa	0,816 Aa	0,818 Aa	0,808 Aa	0,788 Ab	0,651 Ac	0,134 Ad
Eficiência quântica do fotossistema II aos 15 DAA								
	0,0	3,6	7,2	18,0	36,0	72,0	180,0	360,0
0,5X	0,817 Aa	0,820 Aa	0,823 Aa	0,826 Aa	0,779 Bb	0,728 Bc	0,00 Ad	0,00 Ad
1X	0,822 Aa	0,821 Aa	0,819 Aa	0,816 Aa	0,823 Aa	0,818 Aa	0,00 Ab	0,00 Ab
1,5X	0,818 Aa	0,823 Aa	0,820 Aa	0,815 Aa	0,823 Aa	0,816 Aa	0,00 Ab	0,00 Ab

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Teores de lipoperóxidos

Diferenças nos teores de lipoperóxidos (teor de MDA no tecido foliar) não foram constatadas entre as concentrações de fósforo. Já entre as doses de glyphosate, o maior teor de MDA foi quantificado após a pulverização de 360 g e.a. ha⁻¹, atingindo valores até 41,2% maior que a testemunha sem aplicação de glyphosate (Tabela 18).

Tabela 18. Teor de malondialdeído em folhas do clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 15 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

Teor de MDA	
----- nmol g ⁻¹ de tecido foliar fresco -----	
Concentrações de fósforo	
0,5X	5,30 A ¹
1X	5,13 A
1,5X	5,27 A
Doses de glyphosate	
0,0	4,52 C
7,2	4,45 C
36,0	4,90 C
72,0	5,24 BC
180,0	5,93 AB
360,0	6,38 A
F fósforo	0,045 ^{NS}
F glyphosate	17,088 ^{**}
F fósforo x glyphosate	1,209 ^{NS}
DMS² fósforo	0,4807
DMS glyphosate	0,8465
CV³ (%)	8,80

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate não foi significativa para o teor de lipoperóxidos (Tabela 18).

Nutrição

Diferenças entre os concentrações de fósforo nos teores de nutrientes foliares do clone I144 ocorreram apenas para P, Ca e Mg. O acúmulo desses nutrientes nos tecidos foliares foi 23,0; 30,8 e 17,8% menor nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo em relação àquelas cultivadas com 1X. Já o efeito isolado das doses de glyphosate ocasionaram reduções significativas apenas no teor de Ca após a

pulverização de 180 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate. O teor desse nutriente foi reduzido em 9,4% (Tabela 19).

Tabela 19. Teores nutricionais foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e boro (B) no clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 35 dias após a aplicação das doses de glyphosate.

Teores nutricionais foliares						
	N	P	K	Ca	Mg	B
	----- g kg ⁻¹ -----					mg kg ⁻¹
Concentrações de fósforo						
0,5X	24,15 A ¹	1,27 B	10,68 A	7,09 B	2,35 B	37,09 A
1,0X	24,11 A	1,65 A	10,38 A	10,26 A	2,86 A	40,73 A
1,5X	26,53 A	1,69 A	10,65 A	10,08 A	2,91 A	41,18 A
Doses de glyphosate						
0,0	24,43 A	1,59 A	10,86 A	9,17 A	2,85 A	38,86 A
7,2	23,56 A	1,52 A	10,81 A	9,41 A	2,75 A	38,90 A
36,0	24,09 A	1,56 A	10,90 A	9,62 A	2,78 A	38,34 A
180,0	23,63 A	1,61 A	10,04 A	8,30 B	2,45 A	39,89 A
F fósforo	81,108 ^{NS}	19,347 ^{**}	52,146 ^{NS}	51,146 [*]	9,513 ^{**}	36,053 ^{NS}
f glyphosate	1,397 ^{NS}	0,293 ^{NS}	0,314 ^{NS}	3,761 [*]	2,393 ^{NS}	0,986 ^{NS}
F fósforo x glyphosate	1,285 ^{NS}	0,447 ^{NS}	0,659 ^{NS}	2,948 ^{NS}	2,368 ^{NS}	0,246 ^{NS}
DMS² fósforo	1,1285	0,2294	0,5599	0,9364	0,3766	2,1335
DMS glyphosate	1,4500	0,2947	0,7194	1,2031	0,4839	2,7411
CV³ (%)	3,53	7,91	4,23	7,67	10,41	4,10

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. ^{*}Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{**}Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Interações entre fósforo e glyphosate não foram constatadas nos teores de N, P, K, Ca, Mg e B nas folhas das plantas do clone I144 (Tabela 19).

Já para os teores nutricionais radiculares, diferentes concentrações de fósforo resultaram em diferenças significativas nos teores de P e K. Os menores teores desses nutrientes foram quantificados nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo, e foram 34,1 e 8,3% menores (P e K, respectivamente) quando comparados aos teores de plantas cultivadas com 1,5 X de fósforo (Tabela 20).

A pulverização de 36 g e.a. ha⁻¹ glyphosate promoveu incremento no teor de boro nas raízes, e este aumento foi de 9,4%. Para os outros nutrientes, não foram constatadas alterações em função da pulverização de glyphosate. Interações entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate não foram estabelecidas para nenhum dos nutrientes quantificados nas raízes do clone I144 (Tabela 20).

Tabela 20. Teores nutricionais radiculares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e boro (B) no clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 35 dias após a aplicação das doses de glyphosate.

Teores nutricionais radiculares						
	N	P	K	Ca	Mg	B
	----- g kg ⁻¹ -----			----- mg kg ⁻¹ -----		
Concentrações de fósforo						
0,5X	5,63 A ¹	0,58 B	4,97 B	4,53 A	1,78 A	19,39 A
1X	5,89 A	0,80 A	5,37 AB	4,55 A	1,70 A	19,12 A
1,5X	5,91 A	0,88 A	5,42 A	4,76 A	1,84 A	19,28 A
Doses de glyphosate						
0,0	5,67 A	0,71 A	5,28 A	4,33 A	1,55 A	17,92 B
7,2	5,74 A	0,75 A	5,32 A	4,26 A	1,50 A	17,54 B
36,0	5,91 A	0,78 A	5,19 A	4,24 A	1,54 A	19,61 A
180,0	5,93 A	0,70 A	5,24 A	4,27 A	1,57 A	17,99 B
F fósforo	2,723 ^{NS}	45,543*	4,802*	44,626 ^{NS}	121,218 ^{NS}	0,210 ^{NS}
f glyphosate	1,491 ^{NS}	1,513 ^{NS}	0,167 ^{NS}	0,102 ^{NS}	0,501 ^{NS}	6,770**
F fósforo x glyphosate	0,902 ^{NS}	1,884 ^{NS}	1,865 ^{NS}	0,348 ^{NS}	1,281 ^{NS}	1,477 ^{NS}
DMS ² fósforo	0,3485	0,0875	0,4233	0,3723	0,1394	1,1534
DMS glyphosate	0,4477	0,1125	0,5438	0,4783	0,1791	1,4819
CV ³ (%)	4,49	8,65	6,03	6,51	6,75	4,73

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Crescimento

Antes da pulverização de glyphosate (0 DAA), diferenças significativas na altura das plantas não foram constatadas entre as concentrações de fósforo ou entre as doses de glyphosate para o clone I144 cultivado em casa de vegetação utilizando

areia como substrato. Aos 7, 21 e 35 DAA, as plantas cultivadas com 0,5X apresentaram alturas 4,7; 6,3 e 4,2% menores que as plantas cultivadas com 1,5X, respectivamente (Tabela 21).

Tabela 21. Altura do clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 0, 7, 21 e 35 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

	Altura			
	0 DAA	7 DAA	21 DAA	35 DAA
	----- cm -----			
Concentrações de fósforo				
0,5X	37,81 A ¹	39,87 B	42,14 B	45,65 B
1X	37,26 A	39,82 B	42,40 B	46,71 AB
1,5X	37,07 A	41,84 A	45,00 A	47,68 A
Doses de glyphosate				
0,0	37,25 A	40,34 AB	43,70 A	47,45 A
3,6	36,95 A	40,95 AB	45,16 A	49,04 A
7,2	37,29 A	41,50 A	44,95 A	50,08 A
18,0	37,54 A	41,66 A	44,62 A	50,04 A
36,0	37,66 A	41,45 A	45,29 A	50,33 A
72,0	37,33 A	40,16 AB	44,62 A	49,66 A
180,0	37,66 A	39,12 AB	39,54 B	39,58 B
360,0	37,37 A	38,12 B	37,54 B	37,29 B
F fósforo	0,599 ^{NS}	6,807 ^{**}	10,707 ^{**}	3,793 [*]
F glyphosate	0,087 ^{NS}	3,105 ^{**}	14,031 ^{**}	37,421 [*]
F fósforo x glyphosate	0,293 ^{NS}	0,773 ^{NS}	0,863 ^{NS}	1,015 ^{NS}
DMS² fósforo	1,6695	1,4916	1,6344	1,7648
DMS² glyphosate	3,5556	3,1771	3,4813	3,7591
CV³ (%)	7,46	6,15	6,32	6,18

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. ^{*}Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{**}Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Aos 7 DAA da maior dose de glyphosate (360 g e.a. ha⁻¹) a altura das plantas foi reduzida em 5,5%. Aos 21 e 35 DAA de 360 g e.a. ha⁻¹, a altura das plantas foi 13,9 e 21,4% menor, respectivamente, quando comparada as testemunhas sem aplicação de glyphosate (Tabela 21). Ainda aos 7 DAA, as doses 7,2; 18 e 36 g e.a.

ha⁻¹ incrementaram a altura das plantas em mais de 2,0%. Interações entre fósforo e glyphosate não foram significativas (Tabela 21).

Para o diâmetro do caule das plantas, diferenças significativas entre as concentrações de fósforo foram constatadas somente aos 7 DAA, ocasião em que o diâmetro foi cerca de 9,0% maior nas plantas nutridas com 1,5X de fósforo (Tabela 22).

Tabela 22. Diâmetro do caule do clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 0, 7, 21 e 35 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

	Diâmetro do caule			
	0 DAA	7 DAA	21 DAA	35 DAA
	----- mm -----			
Concentrações de fósforo				
0,5X	4,06 A ¹	4,28 B	4,80 A	5,53 A
1X	3,93 A	4,37 B	5,04 A	5,49 A
1,5X	4,09 A	4,71 A	5,08 A	5,55 A
Doses de glyphosate				
0,0	3,94 A	4,49 A	4,99 A	5,48 AB
3,6	4,01 A	4,45 A	5,05 A	5,62 AB
7,2	4,07 A	4,46 A	5,04 A	5,78 A
18,0	4,03 A	4,44 A	5,17 A	5,78 A
36,0	4,00 A	4,43 A	5,00 A	5,71 AB
72,0	4,14 A	4,46 A	4,91 A	5,39 AB
180,0	4,01 A	4,45 A	4,89 A	5,35 AB
360,0	4,02 A	4,43 A	4,74 A	5,08 B
F fósforo	0,870 ^{NS}	6,919 ^{**}	2,655 ^{NS}	0,086 ^{NS}
F glyphosate	0,144 ^{NS}	0,015 ^{NS}	0,720 ^{NS}	2,432 [*]
F fósforo x glyphosate	0,278 ^{NS}	0,099 ^{NS}	0,283 ^{NS}	0,712 ^{NS}
DMS² fósforo	0,3117	0,2896	0,3129	0,3279
DMS² glyphosate	0,6639	0,6168	0,6407	0,6984
CV³ (%)	10,92	10,86	10,50	9,91

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. ^{*}Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{**}Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Já entre as doses de glyphosate, diferenças foram constatadas apenas aos 35 DAA, e as plantas pulverizadas com 360,0 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate tiveram seu diâmetro do caule reduzido em 7,2% quando comparados à testemunha sem aplicação do herbicida. Ainda sobre o comportamento do glyphosate nas plantas de eucalipto do clone I144, as doses 7,2 e 18 g e.a. ha⁻¹ incrementaram o diâmetro do caule em 4,8%. Não ocorreram interações entre fósforo e glyphosate (Tabela 22).

Para o número de folhas do clone I144, diferenças significativas entre as concentrações de fósforo foram constatadas apenas aos 7 e 21 DAA (Tabela 23).

Tabela 23. Número de folhas do clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 0, 7, 21 e 35 dias após a aplicação (DAA) das doses de glyphosate.

	Número de folhas			
	0 DAA	7 DAA	21 DAA	35 DAA
Concentrações de fósforo				
0,5X	30,31 A ¹	30,93 B	38,15 B	43,75 A
1X	29,90 A	36,31 A	36,96 B	46,25 A
1,5X	31,25 A	38,03 A	47,93 A	54,59 A
Doses de glyphosate				
0,0	29,75 A	37,00 AB	42,91 A	53,16 A
3,6	29,50 A	38,41 A	44,41 A	54,83 A
7,2	30,08 A	38,12 A	46,91 A	54,91 A
18,0	29,16 A	38,04 A	49,16 A	53,75 A
36,0	30,75 A	39,54 A	49,58 A	55,83 A
72,0	30,16 A	39,29 A	48,16 A	50,00 A
180,0	29,91 A	29,33 B	29,58 B	25,33 B
360,0	30,16 A	21,00 C	17,41 C	13,75 C
F fósforo	0,495 ^{NS}	11,092 ^{**}	27,999 ^{**}	1,066 ^{NS}
F glyphosate	0,156 ^{NS}	13,095 ^{**}	38,441 ^{**}	62,694 ^{**}
F fósforo x glyphosate	0,262 ^{NS}	0,686 ^{NS}	0,798 ^{NS}	1,190 ^{NS}
DMS² fósforo	2,7514	3,7614	3,8510	4,2400
DMS² glyphosate	5,8658	8,0118	8,8510	9,0504
CV³ (%)	10,43	7,91	15,69	15,71

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Para as doses de glyphosate, diferenças estatísticas foram constatadas a partir dos 7 DAA, sendo as doses 180 e 360 g e.a. ha⁻¹ responsáveis pelas maiores reduções no número de folhas. Aos 35 DAA, essas doses reduziram o número de folhas quando comparadas à testemunha. Interações entre as concentrações de fósforo e de glyphosate sobre o número de folhas não foram constatadas (Tabela 23).

As maiores concentrações de fósforo promoveram os maiores acúmulos nas massas secas de folhas e caule (Tabela 24).

Tabela 24. Massas secas de folhas (MSF), caule (MSC) e raízes (MSR) do clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 35 dias após a aplicação das doses de glyphosate.

Massas secas			
	MSF	MSC	MSR
	----- gramas -----		
Concentrações de fósforo			
0,5X	5,92 B ¹	3,74 B	13,70 A
1X	6,12 A	4,14 A	11,49 B
1,5X	6,80 A	4,19 A	11,57 B
Doses de glyphosate			
0,0	7,27 A	4,27 A	11,62 A
3,6	7,41 A	4,39 A	11,58 A
7,2	7,32 A	4,63 A	11,89 A
18,0	7,31 A	4,43 A	11,73 A
36,0	7,42 A	4,42 A	12,43 A
72,0	6,92 A	3,94 B	11,62 A
180,0	2,17 B	3,43 B	11,20 A
360,0	1,45 C	2,70 C	9,34 B
F fósforo	0,0022**	0,0010**	0,0021**
F glyphosate	0,0017**	0,0005**	0,0090**
F fósforo x glyphosate	0,2423 ^{NS}	0,7819NS	0,8014 ^{NS}
DMS² fósforo	0,1988	0,2270	0,5436
DMS² glyphosate	0,8494	0,4836	1,1579
CV³ (%)	10,60	9,41	7,93

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Já a massa seca de raízes foi maior nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo quando comparadas as plantas cultivadas com as maiores doses de fósforo (Tabela 24). As maiores doses de glyphosate restringiram o acúmulo de massa seca pelas plantas do clone I144.

Comparando as massas secas das testemunhas (0,0 g e.a. ha⁻¹ glyphosate) com as massas secas das plantas pulverizadas com 360,0 g e.a. ha⁻¹, as reduções foram de 80,0; 36,7 e 19,6% para massa seca de folhas, caule e raízes, respectivamente. Interações entre fósforo e glyphosate não foram constatadas para as massas secas de folhas, caule e raízes (Tabela 24).

Experimento III - em câmara de crescimento - clone GG100

Características fotossintéticas

Analisando o efeito isolado das concentrações de fósforo, foi possível perceber que as plantas de eucalipto cultivadas com 1X e 1,5X de fósforo apresentaram maiores teores de clorofila **a** (Tabela 25).

Já para a comparação das doses de glyphosate, não foram constatadas diferenças significativas momentos antes da aplicação (0 HAA). As 144 HAA, a redução do teor relativo de clorofila **a** pela dose 0,578 g e.a. de glyphosate foi de 4,4%. Às 360 HAA, as reduções no teor de clorofila **a** pelas doses 0,288 e 0,576 g e.a. de glyphosate foram de 7,4 e 2,9%, respectivamente (Tabela 25).

Interações entre as concentrações de fósforo e as doses de glyphosate ocorreram às 144 e 360 HAA (Tabela 25). Às 144 HAA de 0,576 g e.a. de glyphosate, o teor de clorofila **a** das plantas cultivadas com 0,5X de fósforo teve incremento; enquanto os teores das plantas cultivadas com 1X foram reduzidos; e os teores das plantas cultivadas com 1,5X se mantiveram praticamente inalterados (comparação entre as médias das doses de glyphosate 0,000 e 0,576 g e.a.). Comportamento semelhante foi observado às 360 HAA (Tabela 26).

Tabela 25. Teor relativo de clorofila **a** nas folhas do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) às 0, 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila a			
	0 HAA	144 HAA	360 HAA
	----- unidades relativas -----		
Concentrações de fósforo			
0,5X	26,84 C ¹	25,92 C	23,04 C
1X	33,42 B	31,88 B	30,30 B
1,5X	35,38 A	35,24 A	39,42 A
Doses de glyphosate (g e.a.)			
0,000	31,85 A	31,25 A	30,86 A
0,017	31,88 A	31,33 A	30,80 A
0,034	32,14 A	31,36 A	30,58 A
0,072	32,21 A	31,28 A	30,71 A
0,144	31,50 A	31,52 A	30,31 A
0,288	32,05 A	30,37 AB	28,55 B
0,576	31,54 A	29,87 B	29,97 B
F fósforo	1081,511**	630,821**	2371,705**
F glyphosate	1,809 ^{NS}	4,675**	61,885**
F fósforo x glyphosate	0,645 ^{NS}	2,781**	30,712**
DMS² fósforo	0,4674	0,6457	0,4545
DMS² glyphosate	0,9095	1,2565	0,3345
CV³ (%)	1,95	2,78	2,03

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Para o teor de clorofila **b**, a comparação desse teor nas plantas cultivadas com 0,5 e 1X de fósforo resultou em diferenças de 11,4 e 20,5% às 0 e 144 HAA, respectivamente. Já às 360 HAA, a maior concentração de fósforo resultou em incrementos quando comparada a menor concentração de fósforo (Tabela 27).

Tabela 26. Desdobramento da interação entre as concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre o teor relativo de clorofila **a** no clone GG100 às 0, 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila a (unidades relativas) às 144 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	25,7 Ca ¹	25,9 Ca	25,9 Ca	25,8 Ca	26,2 Ca	25,7 Ca	26,3 Ba
1X	32,5 Ba	32,0 Ba	32,0 Ba	32,3 Ba	31,8 Ba	31,0 Ba	31,0 Aa
1,5X	35,5 Aa	36,1 Aa	36,1 Aa	35,7 Aa	36,4 Aa	35,3 Aa	35,3 Aa

Teor de clorofila a (unidades relativas) às 360 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	24,07 Ca	23,60 Cab	22,96 Cab	22,50 Cab	22,83 Cab	22,90 Cb	22,46 Bb
1X	30,70 Babc	31,16 Bab	30,00 Babc	31,20 Ba	30,66 Babc	29,66 Bbc	29,23 Ac
1,5X	37,83 Aa	37,83 Aa	38,10 Aa	38,40 Aa	37,43 Aa	38,10 Aa	38,40 Aa

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

O efeito isolado das doses de glyphosate ocasionou reduções no teor relativo de clorofila **b** às 144 e 360 HAA. As 360 HAA, as maiores doses de glyphosate reduziram o teor de clorofila **b** nas folhas medianas do clone GG100 (Tabela 27).

A interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate, significativa às 144 e 360 HAA, indicou que os menores teores relativos de clorofila **b** foram mensurados nas plantas cultivadas com a menor concentração de fósforo e na presença das maiores doses de glyphosate. Às 360 HAA, o teor relativo de clorofila **b** foi reduzido em 15,5% nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo; em 7,4% nas plantas cultivadas com 1X de fósforo; e em 6,5% nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo (Tabela 28).

Tabela 27. Teor relativo de clorofila **b** nas folhas do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) às 0, 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila <i>b</i>			
	0 HAA	144 HAA	360 HAA
----- unidades relativas -----			
Concentrações de fósforo			
0,5X	12,75 C ¹	9,92 C	10,73 B
1X	14,40 B	11,6 B	10,19 B
1,5X	15,83 A	14,8 A	12,50 A
Doses de glyphosate (g e.a.)			
0,000	14,37 A	14,34 A	12,80 A
0,017	14,16 A	14,05 A	12,52 A
0,034	14,58 A	13,92 AB	12,33 AB
0,072	14,20 A	13,41 B	12,45 AB
0,144	14,18 A	11,41 C	10,53 BC
0,288	14,55 A	9,66 D	10,16 C
0,576	14,43 A	7,98 E	9,52 C
F fósforo	82,731**	676,407**	13,389**
F glyphosate	0,362 ^{NS}	291,313**	7,570**
F fósforo x glyphosate	0,9058 ^{NS}	69,602**	0,952**
DMS² fósforo	0,5828	0,3281	1,1054
DMS² glyphosate	1,1342	0,6386	2,1511
CV² (%)	3,42	3,61	3,77

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Uma vez que o teor relativo de clorofila total é a soma dos teores relativos das clorofilas **a** e **b**, os comportamentos acima descritos, em geral, se repetiram: maiores teores de clorofila total mensurados nas plantas cultivadas com maiores concentrações de fósforo e redução destes teores após a aplicação das maiores doses de glyphosate (Tabela 29).

Tabela 28. Efeitos da interação entre as concentrações de fósforo e doses glyphosate sobre o teor relativo de clorofila **b** no clone GG100 às 0, 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor de clorofila <i>b</i> às 144 HAA (unidades relativas)							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	12,60 Ba ¹	12,06 Ba	12,66 Ba	12,60 Ba	6,80 Cb	6,31 Cb	6,45 Cb
1X	12,00 Ba	11,73 Ba	11,96 Ba	11,63 Ca	12,00 Ba	12,23 Aa	9,56 Ab
1,5X	18,36 Aa	18,36 Aa	17,13 Ab	16,00 Ac	15,43 Ac	10,43 Bd	7,96 Be
Teor de clorofila <i>b</i> às 360 HAA (unidades relativas)							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	37,77 Ca	36,10 Cab	35,83 Cabc	35,06 Cabc	33,40Cbc	33,43 Cbc	31,90 Bc
1X	41,66 Ba	42,46 Ba	41,76 Ba	42,26 Ba	38,63 Ba	39,30 Ba	38,56 Aa
1,5X	51,56 Aa	51,60 Aa	51,16 Aa	52,16 Aa	50,50 Aa	48,40 Ab	48,20 Ab

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate foi significativa às 144 e 360 HAA (Tabela 29). Às 360 HAA, de 0,288 e 0,576 g e.a. de glyphosate os teores de clorofila total foram 23,0 e 16,4% menores nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo quando comparado ao teor de clorofila total nas plantas cultivadas com 1,5X de fósforo, após a aplicação de 0,288 e 0,576 g e.a. de glyphosate, respectivamente (Tabela 30).

As Fv/Fm mensuradas nas folhas do clone GG100 não apresentaram reduções indicativas de estresses no aparato fotossintético entre às 0 e 96 HAA. As médias para esses períodos oscilaram entre 0,812 e 0,824 (Tabelas 31 e 32).

Tabela 29. Teor relativo de clorofila total nas folhas do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) às 0, 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila total			
	0 HAA	144 HAA	360 HAA
	----- unidades relativas -----		
Concentrações de fósforo			
0,5X	39,39 C ¹	38,85 C	34,78 C
1X	48,83 B	43,43 B	40,66 B
1,5X	51,21 A	50,06 A	48,37 A
Doses de glyphosate (g e.a.)			
0,000	46,23 A	46,60 A	43,66 A
0,017	46,04 A	45,38 A	43,38 A
0,034	46,73 A	45,25 A	42,92 A
0,072	46,41 A	44,70 A	43,16 A
0,144	46,68 A	42,93 B	40,84 BC
0,288	46,50 A	40,04 C	38,72 C
0,576	45,97 A	37,87 D	36,22 D
F fósforo	652,606**	1089,750**	401,751**
F glyphosate	0,933 ^{NS}	85,508**	30,103**
F fósforo x glyphosate	0,619 ^{NS}	18,848**	7,350**
DMS² fósforo	0,8055	0,7404	1,1686
DMS² glyphosate	1,5645	1,4408	2,2742
CV³ (%)	2,32	2,29	3,77

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Tabela 30. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre o teor relativo de clorofila total no clone GG100 às 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor de clorofila total às 144 HAA (unidades relativas)							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	38,33 Ca ¹	37,76 Ca	38,61 Ca	38,40 Ca	33,03 Cb	32,04 Bb	32,75 Bb
1X	44,56 Ba	43,86 Ba	44,00 Ba	43,96 Ba	43,86 Ba	43,23 Aa	40,56 Ab
1,5X	53,90 Aab	54,53 Aa	53,23 Aab	51,73 Ab	51,90 Ab	44,83 Ac	40,30 Ac

Teor de clorofila total às 360 HAA (unidades relativas)							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	37,77 Ca	36,10 Cab	35,83 Cab	35,06 Cab	33,40 Cbc	33,43 Cbc	31,90 Bc
1X	41,66 Ba	42,46 Ba	41,76 Ba	42,26 Ba	38,63 Ba	39,30 Ba	38,56 Aa
1,5X	51,56 Aa	51,60 Aa	51,16 Aa	52,16 Aa	50,50 Aa	43,43 Ab	38,20 Ac

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Tabela 31. Eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) nas folhas do clone GG100 cultivado com uso de solução nutritiva com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) às 0, 1, 24, 48 e 72 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Eficiência quântica do fotossistema II					
	0 HAA	1 HAA	24 HAA	48 HAA	72 HAA
Concentrações de fósforo					
0,5X	0,824 A ¹	0,821 A	0,822 A	0,820 A	0,817 A
1X	0,822 A	0,820 AB	0,812 A	0,819 A	0,819 A
1,5X	0,822 A	0,815 B	0,819 A	0,822 A	0,820 A
Doses de glyphosate (g e.a.)					
0,000	0,823 A	0,822 A	0,819 A	0,823 A	0,822 A
0,017	0,824 A	0,814 A	0,821 A	0,817 A	0,819 A
0,034	0,823 A	0,817 A	0,817 A	0,819 A	0,817 A
0,072	0,823 A	0,821 A	0,818 A	0,820 A	0,817 A
0,144	0,821 A	0,819 A	0,823 A	0,820 A	0,819 A
0,288	0,824 A	0,819 A	0,819 A	0,822 A	0,819 A
0,576	0,822 A	0,820 A	0,820 A	0,820 A	0,820 A
F fósforo	0,447 ^{NS}	3,648 ^{NS}	1,631 ^{NS}	1,277 ^{NS}	1,075 ^{NS}
F glyphosate	0,205 ^{NS}	0,982 ^{NS}	0,515 ^{NS}	0,687 ^{NS}	0,675 ^{NS}
F fósforo x glyphosate	0,508 ^{NS}	1,044 ^{NS}	0,288 ^{NS}	0,641 ^{NS}	0,694 ^{NS}
DMS² fósforo	0,0053	0,0061	0,0062	0,0059	0,0049
DMS² glyphosate	0,0105	0,0122	0,0122	0,0117	0,0096
CV³ (%)	0,68	0,79	0,79	0,76	0,63

^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Dentre as concentrações de fósforo, a redução das Fv/Fm nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo foram de 12,7; 2,9 e 30,6% quando comparadas as plantas cultivadas com 1,5X de fósforo às 144, 168 e 360 HAA de glyphosate, respectivamente. Quando comparadas as testemunhas, as doses de glyphosate 0,144; 0,288 e 0,576 g e.a. reduziram a atividade do PSII às 144 HAA. As doses 0,288 e 0,576 g e.a. de glyphosate ocasionaram reduções de 22,0 e 60,6% da Fv/Fm, respectivamente, às 168 HAA. Já às 360 HAA os valores de Fv/Fm foram inferiores a 0,750 a partir das doses 0,072 g e.a. de glyphosate. Ainda nessa última avaliação, as doses 0,072; 0,144; 0,288 e 0,576 g e.a. de glyphosate reduziram a Fv/Fm em 10,5; 29,5; 47,0 e 56,3%, respectivamente (Tabela 32).

Tabela 32. Eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) nas folhas do clone GG100 cultivado com uso de solução nutritiva com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) às 96, 120, 144, 168 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Eficiência quântica do fotossistema II					
	96 HAA	120 HAA	144 HAA	168 HAA	360 HAA
Concentrações de fósforo					
0,5X	0,818 A ¹	0,713 B	0,689 C	0,682 A	0,504 B
1X	0,816 A	0,808 A	0,761 B	0,725 A	0,713 A
1,5X	0,818 A	0,811 A	0,790 A	0,723 A	0,727 A
Doses de glyphosate (g e.a.)					
0,000	0,823 A	0,822 A	0,822 A	0,820 A	0,822 A
0,017	0,817 A	0,818 AB	0,814 A	0,802 A	0,806 A
0,034	0,818 A	0,816 AB	0,805 A	0,783 A	0,802 A
0,072	0,812 A	0,818 AB	0,801 A	0,788 A	0,735 B
0,144	0,815 A	0,804 BC	0,774 AB	0,767 A	0,579 C
0,288	0,819 A	0,793 C	0,746 B	0,639 B	0,435 D
0,576	0,815 A	0,573 D	0,465 C	0,323 C	0,359 E
F fósforo	0,978 ^{NS}	563,398**	52,798**	0,335 ^{NS}	583,459**
F glyphosate	2,556 ^{NS}	637,256**	136,137**	10,021*	591,794**
F fósforo x glyphosate	1,080 ^{NS}	506,218**	40,143**	1,144 ^{NS}	108,121**
DMS² fósforo	0,0050	0,0084	0,0254	0,1310	0,0183
DMS² glyphosate	0,0098	0,0165	0,0500	0,254	0,0362
CV³ (%)	0,64	1,13	3,57	2,54	2,98

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Por meio da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate foi possível notar que as plantas cultivadas com as menores doses de fósforo apresentaram maior redução do PSII, e esse efeito foi mais acentuado nas doses de glyphosate maiores que 0,144 g e.a. (Tabela 33).

Às 120 HAA de 0,576 g e.a. de glyphosate, o aparato fotossintético das folhas medianas das plantas cultivadas com 1X e 1,5X de fósforo apresentavam-se “normais”. Já para as plantas cultivadas com 0,5X de fósforo a Fv/Fm foi reduzida em mais de 80,0%. A partir das 144 HAA foram constatadas alterações no PSII independentemente das concentrações de fósforo. Contudo, reduções de mais de 80,0% no rendimento quântico máximo do PSII foram observadas nas menores concentrações de fósforo (Tabela 33).

Tabela 33. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre a eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) no clone GG100 às 120, 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Eficiência quântica do fotossistema II às 120 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	0,822 Aa ¹	0,821 Aa	0,812 Aa	0,820 Aa	0,793 Ab	0,783 Ab	0,141 Bc
1X	0,818 Aa	0,816 Aa	0,817 Aa	0,816 Aa	0,809 Aa	0,792 Aa	0,792 Aa
1,5X	0,825 Aa	0,819 Aa	0,819 Aa	0,818 Aa	0,810 Aa	0,804 Aab	0,786 Ab
Eficiência quântica do fotossistema II às 144 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	0,822 Aa	0,806 Aa	0,785 Aa	0,779 Aa	0,774 Aa	0,758 Aa	0,104 Cb
1X	0,823 Aa	0,822 Aa	0,811 Aa	0,814 Aa	0,752 Ab	0,730 Ab	0,574 Bc
1,5X	0,822 Aa	0,815 Aa	0,819 Aa	0,811 Aa	0,798 Aab	0,750 Aab	0,717 Ab
Eficiência quântica do fotossistema II às 360 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	0,823 Aa	0,786 Aa	0,777 Aa	0,705 Bb	0,205 Bc	0,166 Cc	0,069 Bd
1X	0,823 Aa	0,812 Aa	0,812 Aa	0,784 Aa	0,764 Aa	0,499 Bb	0,499 Ab
1,5X	0,820 Aa	0,820 Aa	0,817 Aa	0,716 Bb	0,768 Ab	0,639 Ac	0,508 Ad

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Às 360 HAA de 0,576 g e.a. de glyphosate, o rendimento quântico do PSII foi reduzido em 91,6% nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo; em 39,3% nas plantas cultivadas com 1X de fósforo e 38,0% nas plantas cultivadas com 1,5X de fósforo (Tabela 33).

As taxas fotossintéticas do clone GG100 foram significativamente diferentes em função das concentrações de fósforo utilizadas somente às 96 e 120 HAA. Nessas avaliações, essas características foram, respectivamente, 13,5 e 18,5% menores nas plantas cultivadas com 0,5X quando comparadas as plantas cultivadas com 1,5X de fósforo (Tabelas 34 e 35).

Tabela 34. Taxa fotossintética do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) as 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

	Taxa fotossintética			
	0 HAA	24 HAA	48 HAA	72 HAA
	----- $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ -----			
Concentrações de fósforo				
0,5X	21,21 A ¹	21,73 A	21,78 A	21,66 A
1X	21,30 A	22,06 A	21,96 A	21,97 A
1,5X	21,60 A	21,90 A	21,68 A	22,15 A
Doses de glyphosate (g e.a.)				
0,000	21,05 A	21,87 A	21,41 A	21,92 A
0,017	21,34 A	21,70 A	22,36 A	21,94 A
0,034	20,81 A	21,07 A	20,94 A	21,29 A
0,072	21,42 A	22,09 A	21,78 A	22,09 A
0,144	20,69 A	21,10 A	21,94 A	21,74 A
0,288	21,74 A	21,33 A	21,59 A	21,86 A
0,576	20,16 A	21,76 A	21,77 A	22,04 A
F fósforo	2,879 ^{NS}	1,253 ^{NS}	0,403 ^{NS}	1,981 ^{NS}
F glyphosate	1,507 ^{NS}	0,704 ^{NS}	0,752 ^{NS}	0,674 ^{NS}
F fósforo x glyphosate	1,305 ^{NS}	0,986 ^{NS}	1,482 ^{NS}	1,615 ^{NS}
DMS² fósforo	0,6410	0,7204	0,8055	0,7204
DMS² glyphosate	1,2627	1,4192	1,5867	1,4192
CV³ (%)	7,15	5,47	6,87	8,46

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Diferenças entre as doses de glyphosate foram constatadas a partir das 96 HAA, e as maiores reduções na taxa fotossintética ocorreram após a aplicação radicular de 0,576 g e.a. de glyphosate. Essas reduções foram de 63,1; 92,1; 90,5 e 99,0% às 96; 120; 144 e 168 HAA, respectivamente (Tabela 35).

Tabela 35. Taxa fotossintética do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) as 96, 120, 144 e 168 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

	Taxa fotossintética			
	96 HAA	120 HAA	144 HAA	168 HAA
	----- $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ -----			
Concentrações de fósforo				
0,5X	18,68 B ¹	15,81 C	15,68 A	16,85 A
1X	18,87 B	17,26 B	16,77 A	17,01 A
1,5X	21,64 A	19,41 A	17,51 A	16,94 A
Doses de glyphosate (g e.a. ha⁻¹)				
0,000	21,32 A	21,52 AB	21,73 A	22,02 A
0,017	22,22 A	22,05 AB	21,10 A	21,46 A
0,034	21,97 A	22,26 A	21,82 A	22,73 A
0,072	22,12 A	20,68 B	21,99 A	22,39 A
0,144	22,38 A	18,05 C	14,44 B	13,30 B
0,288	21,25 A	16,19 D	14,90 B	14,70 B
0,576	7,85 B	1,68 E	2,06 C	0,20 C
F fósforo	32,422**	79,841**	5,188 ^{NS}	0,917 ^{NS}
F glyphosate	39,390**	560,178**	143,428**	150,332**
F fósforo x glyphosate	35,725**	10,438**	2,582 ^{NS}	1,112 ^{NS}
DMS² fósforo	1,0400	0,7224	1,9439	2,0130
DMS² glyphosate	2,0486	0,7224	0,4049	2,0130
CV³ (%)	5,53	7,33	9,10	9,67

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Interações entre as concentrações de fósforo e as doses de glyphosate foram significativas somente às 96 e 120 HAA (Tabela 35).

Às 96 HAA não houve diferença na taxa fotossintética após a aplicação de doses até 0,288 g e.a. de glyphosate, independentemente da concentração de fósforo. No entanto, após a aplicação radicular de 0,576 g e.a. de glyphosate, a taxa

fotossintética das plantas cultivadas com 1,5X de fósforo foi superior a 20 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; enquanto a das plantas cultivadas com 1X de fósforo foi de apenas 1,93 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; e nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo a taxa fotossintética não foi mais quantificada (Tabela 36).

Às 120 HAA a redução da taxa fotossintética se iniciou após a aplicação de 0,072 g e.a. de glyphosate, mas apenas nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo. Ainda nessa avaliação, após a aplicação de 0,288 g e.a. de glyphosate a taxas fotossintéticas das plantas cultivadas com 0,5X e 1X de fósforo foram reduzidas em 42,4 e 21,4%, respectivamente. Após a aplicação da maior dose de glyphosate as taxas fotossintéticas mensuradas foram muito baixas para as concentrações 1X e 1,5X de glyphosate, mas ausentes para as plantas cultivadas com 0,5X de fósforo (Tabela 36).

Tabela 36. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre a taxa fotossintética no clone GG100 as 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Taxa fotossintética às 96 HAA ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	21,06 Aa ¹	19,93 Aa	22,64 Aa	22,74 Aa	23,36 Aa	21,03 Aa	0,00 Bb
1X	20,88 Aa	21,68 Aa	22,13 Aa	22,25 Aa	21,65 Aa	21,54 Aa	1,93 Bb
1,5X	22,03 Aa	22,04 Aa	21,12 Aa	21,37 Aa	22,13 Aa	21,18 Aa	21,63 Aa
Taxa fotossintética às 120 HAA ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	20,63 Aa	21,14 Aa	22,43 Aa	18,65 Bb	15,98 Bc	11,84 Cd	0,00 Be
1X	22,39 Aa	22,04 Aa	21,92 Aa	21,03 Aa	15,97 Bb	16,16 Bb	1,29 Bc
1,5X	21,53 Aa	22,98 Aa	22,42 Aa	22,37 Aa	22,21 Aa	20,57 Aa	3,76 Ab

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Para a condutância estomática, diferenças significativas entre as concentrações de fósforo ocorreram somente às 144 HAA, e a maior condutância foi mensurada nas plantas cultivadas com 1X e 1,5X de fósforo (Tabelas 37 e 38).

Após a aplicação de glyphosate, alterações na condutância estomática foram constatadas a partir das 120 HAA. As reduções dessa característica após a aplicação de 0,144 g e.a. de glyphosate foram de 19,0; 36,3 e 45,0% às 120, 144 e

168 HAA, respectivamente. Já as reduções ocasionadas pela aplicação de 0,576 g e.a. de glyphosate foram de 28,5; 40,9 e 55,0% às 120, 144 e 168 HAA, respectivamente. (Tabela 38).

Tabela 37. Condutância estomática do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) às 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Condutância estomática				
	0 HAA	24 HAA	48 HAA	72 HAA
	----- $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -----			
Concentrações de fósforo				
0,5X	0,22 A ¹	0,19 A	0,20 B	0,23 A
1X	0,21 A	0,22 A	0,21 A	0,24 A
1,5X	0,20 A	0,21 A	0,22 A	0,24 A
Doses de glyphosate (g e.a.)				
0,000	0,23 A	0,20 A	0,21 A	0,23 A
0,017	0,21 A	0,22 A	0,21 A	0,25 A
0,034	0,21 A	0,20 A	0,22 A	0,24 A
0,072	0,20 A	0,23 A	0,20 A	0,22 A
0,144	0,23 A	0,21 A	0,21 A	0,23 A
0,288	0,21 A	0,24 A	0,22 A	0,24 A
0,576	0,20 A	0,20 A	0,20 A	0,24 A
F fósforo	0,559 ^{NS}	1,563 ^{NS}	7,950 ^{**}	1,977 ^{NS}
F glyphosate	1,104 ^{NS}	0,185 ^{NS}	2,583 ^{NS}	0,896 ^{NS}
F fósforo x glyphosate	1,452 ^{NS}	0,099 ^{NS}	1,124 ^{NS}	0,397 ^{NS}
DMS² fósforo	0,151	0,1314	0,0080	0,1001
DMS² glyphosate	0,1786	0,1077	0,0340	0,0871
CV³ (%)	6,40	6,96	3,94	6,42

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Interações entre fósforo e glyphosate ocorreram apenas às 144 HAA (Tabela 38). De modo geral, não houve alterações na condutância estomática na folha mediana do clone GG100, independentemente da concentração de fósforo, após a aplicação de doses até 0,034 g e.a. de glyphosate. No entanto, a partir da aplicação de 0,072 g e.a. de glyphosate a condutância estomática foi reduzida, e esse fato ocorreu com maior intensidade nas plantas cultivadas com 0,5X e 1X de fósforo.

Após a aplicação de 0,144; 0,288 e 0,576 g e.a. de glyphosate, a condutância estomática foi reduzida em, respectivamente, 35,0; 40,0 e 35,3% nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo quando comparadas as cultivadas com 1,5X de fósforo (Tabela 39).

Tabela 38. Condutância estomática do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) às 96, 120, 144 e 168 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

	Condutância estomática			
	96 HAA	120 HAA	144 HAA	168 HAA
	----- $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -----			
Concentrações de fósforo				
0,5X	0,21 A ¹	0,20 A	0,16 A	0,15 A
1X	0,22 A	0,20 A	0,19 A	0,16 A
1,5X	0,20 A	0,20 A	0,20 A	0,17 A
Doses de glyphosate (g e.a. ha⁻¹)				
0,000	0,21 A	0,21 A	0,22 A	0,20 A
0,017	0,20 A	0,21 A	0,22 A	0,20 A
0,034	0,21 A	0,21 A	0,21 A	0,20 A
0,072	0,21 A	0,20 B	0,20 A	0,21 A
0,144	0,22 A	0,17 C	0,14 B	0,11 B
0,288	0,20 A	0,17 C	0,13 B	0,08 C
0,576	0,21 A	0,15 D	0,13 B	0,09 C
F fósforo	1,176 ^{NS}	3,671 ^{NS}	103,132 ^{NS}	0,699 ^{NS}
F glyphosate	0,477 ^{NS}	630,220 ^{**}	140,662 ^{**}	185,507 ^{**}
F fósforo x glyphosate	1,728 ^{NS}	4,688 ^{NS}	577,165 ^{**}	5,915 ^{NS}
DMS² fósforo	0,0144	0,0020	0,0402	0,0142
DMS² glyphosate	0,0284	0,0041	0,0289	0,0018
CV³ (%)	7,12	3,15	5,85	6,73

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Tabela 39. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre a condutância estomática no clone GG100 às 120 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

	Condutância estomática às 120 HAA ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)						
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	0,20 Aa ¹	0,21 Aa	0,20 Aa	0,18 Cb	0,13 Ca	0,12 Cc	0,11 Bd
1X	0,20 Aa	0,21 Aa	0,20 Aa	0,19 Ba	0,19 Ba	0,19 Ba	0,17 Ab
1,5X	0,21 Aa	0,19 Ab	0,21 Aa	0,22 Aa	0,20 Ab	0,20 Ab	0,17 Ac

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico

Diferenças entre os teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico foram constatadas entre as concentrações de fósforo, entre as doses de glyphosate e para a interação desses fatores. As plantas cultivadas com 0,5X de fósforo apresentaram incremento nos teores de glyphosate e cerca nos teores de AMPA e ácido chiquímico (Tabela 40).

Como já esperado, na testemunha não foram quantificados glyphosate ou AMPA, apenas ácido chiquímico ($171,38 \mu\text{g g}^{-1}$ de tecido foliar seco). À medida que a dose aplicada de glyphosate aumentou, os teores de glyphosate e ácido chiquímico também aumentaram (Tabela 40).

O desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate permitiu observar que a aplicação de 0,034 e 0,144 g e.a. de glyphosate não alterou o acúmulo de glyphosate, independentemente da concentração de fósforo utilizada no cultivo das plantas. Já para a dose 0,576 g e.a. de glyphosate, as quantidades desse composto foram maiores nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo. O maior teor de AMPA foi quantificado após a aplicação da maior dose de glyphosate nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo (Tabela 41).

Tabela 40. Teores de glyphosate, ácido aminometilfosfônico (AMPA) e ácido chiquímico nas folhas do clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 15 dias após a aplicação das doses de glyphosate.

Teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico			
	glyphosate	AMPA	ácido chiquímico
	----- $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido foliar seco -----		
Concentrações de fósforo			
0,5X	5,53 A ¹	3,55 A	1030,62 A
1X	4,52 B	2,33 B	797,53 B
1,5X	4,34 B	2,60 B	706,78 B
Doses de glyphosate (g e.a.)			
0,000	0,00 C	0,00 C	171,38 C
0,034	0,14 C	0,13 B	314,33 C
0,144	2,69 B	1,90 B	1266,83 B
0,576	16,36 A	9,28 A	1627,22 A
F fósforo	14,139**	13,941**	20,280**
f glyphosate	1577,339**	496,881**	143,389**
F fósforo x glyphosate	17,064**	5,497**	11,715**
DMS² fósforo	0,6013	0,6026	184,8763
DMS glyphosate	0,7670	0,7686	235,7972
CV³ (%)	12,28	20,86	21,66

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Os maiores teores de ácido chiquímico foram quantificados nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo após a aplicação de 0,144 e 0,576 g e.a. de glyphosate. Já os menores foram quantificados nas plantas cultivadas com 1X e 1,5X de fósforo após a aplicação de 0,000 e 0,034 g e.a. de glyphosate (Tabela 41).

Tabela 41. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre os teores de glyphosate, ácido aminometilfosfônico (AMPA) e ácido chiquímico nas folhas do clone I144.

Teor de glyphosate ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido foliar seco)				
	0,000	0,034	0,144	0,576
0,5X	0,00 Ac ¹	0,13 Ac	2,47 Ab	19,55 Aa
1X	0,00 Ac	0,17 Ac	3,05 Ab	14,80 Ba
1,5X	0,00 Ac	0,13 Ac	2,55 Ab	14,60 Ba
Teor de AMPA ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido foliar seco)				
	0,000	0,034	0,144	0,576
0,5X	0,00 Ab	0,20 Ab	2,84 Ab	11,16 Aa
1X	0,00 Ab	0,09 Ab	1,40 Bb	7,86 Ba
1,5X	0,00 Ab	0,12 Ab	1,46 Bb	8,83 Ba
Teor de ácido chiquímico ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido foliar seco)				
	0,000	0,034	0,144	0,576
0,5X	134,66 Ab	132,83 Ab	2130,00 Aa	1725,00 Aa
1X	233,33 Ac	442,16 Ac	861,33 Bb	1653,30 Ba
1,5X	147,15 Ac	368,01 Ac	808,66 Bb	1503,33 Aa

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e minúsculas (linhas) doses de glyphosate. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Nutrição

A avaliação do teor nutricional foliar indicou diferenças entre as concentrações de fósforo fornecidas às plantas para os teores de P, K, Ca e Mg. O teor de P foi 62,3% menor nas plantas cultivadas com 0,5X quando comparadas as cultivadas com 1X. No entanto, a diferença entre as plantas cultivadas com 1X e 1,5X foi de apenas 2,6% (Tabela 42).

O teor de K foi 22,15% menor nas plantas cultivadas com 0,5X em comparação as plantas cultivadas com a concentração de fósforo recomendada pela solução nutritiva (1X). No entanto, os teores de Ca e Mg foram maiores nas plantas cultivadas com 0,5X.

Tabela 42. Teores foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) no clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 15 após a aplicação das doses de glyphosate.

Teores nutricionais foliares					
	N	P	K	Ca	Mg
	----- g kg ⁻¹ -----				
Concentrações de fósforo					
0,5X	23,06 A ¹	0,70 B	8,40 B	8,56 A	3,07 A
1X	23,61 A	1,86 A	10,79 A	8,49 A	2,62 B
1,5X	24,31 A	1,91 A	11,09 A	7,52 B	2,41 B
Doses de glyphosate (g e.a.)					
0,000	23,11 A	1,41 A	10,75 A	10,29 A	3,39 A
0,034	24,15 A	1,50 A	10,02 A	8,40 B	2,88 B
0,144	24,01 A	1,52 A	10,19 A	7,14 C	2,51 C
0,576	26,07 A	1,54 A	10,21 A	6,97 C	2,12 D
F fósforo	2,003 ^{NS}	356,701 ^{**}	132,920 ^{**}	10,803 ^{**}	39,115 ^{**}
f glyphosate	1,386 ^{NS}	1,970 ^{NS}	3,564 ^{NS}	54,264 ^{**}	94,175 ^{**}
F fósforo x glyphosate	2,472 ^{NS}	1,135 ^{NS}	2,937 ^{NS}	22,385 ^{**}	35,486 ^{**}
DMS ² fósforo	3,4530	0,1373	0,4826	0,6705	0,1826
DMS glyphosate	4,4365	0,1765	0,6200	0,8615	0,2347
CV ³ (%)	4,63	6,88	3,58	6,13	5,01

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Já entre as doses de glyphosate, diferenças foram observadas apenas entre os teores de Ca e Mg, que foram reduzidos em 32,2 e 37,4% após a aplicação de 0,576 g e.a. de glyphosate (Tabela 42).

Interações significativas entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate foram constatadas somente para Ca e Mg (Tabela 42). De modo geral, na ausência de glyphosate os maiores teores de Ca e Mg foram quantificados nas plantas cultivadas com 1,5X de fósforo. Já na presença das doses 0,144 e 0,576 g e.a. de glyphosate, os maiores teores de Ca e Mg foram constatados nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo (Tabela 43).

Tabela 43. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre os teores foliares de cálcio e magnésio.

Teor de cálcio (g kg⁻¹)				
	0,000	0,034	0,144	0,576
0,5X	8,69 Ca ¹	8,29 Aa	8,03 Aa	9,23 Aa
1X	10,28 Ba	8,57 Ab	7,72 Ab	7,39 Bb
1,5X	11,76 Aa	8,35 Ab	5,16 Bc	4,79 Cc
Teor de magnésio (g kg⁻¹)				
	0,000	0,034	0,144	0,576
0,5X	3,14 Ba	2,85 Aa	3,10 Aa	3,17 Aa
1X	3,36 Aba	2,94 Ab	2,65 Bb	1,54 Bc
1,5X	3,67 Aa	2,87 Ab	1,77 Cc	1,64 Bc

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Quanto aos teores nutricionais radiculares, e observando isoladamente o efeito das concentrações de fósforo utilizada no crescimento das plantas, foram constatadas diferenças estatísticas para os teores de P, Ca e Mg. Esses teores foram maiores nas plantas cultivadas com 1X quando comparado aos teores nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo. Os teores de N, K e B não foram alterados em função das concentrações de fósforo (Tabela 44).

Já entre as doses de glyphosate foram observadas diferenças significativas para os teores médios de todos os nutrientes, exceto N (Tabela 44). O teor de P nas plantas após a aplicação de 0,576 g e.a. de glyphosate foi 14,0% menor quando comparado à testemunha (ausência de glyphosate). Os teores de Ca, Mg e B foram 35,3; 45,9 e 36,3% menores após a aplicação da mesma dose de glyphosate (0,576 g e.a.).

Tabela 44. Teor radiculares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e boro (B) no clone GG100 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 15 dias após a aplicação das doses de glyphosate.

Teores nutricionais radiculares						
	N	P	K	Ca	Mg	B
	----- g kg ⁻¹ -----					mg kg ⁻¹
Concentrações de fósforo						
0,5X	5,99 A ¹	0,89 B	3,73 A	4,48 B	0,96 B	16,83 A
1X	6,14 A	1,58 A	3,97 A	5,64 A	1,64 A	16,79 A
1,5X	6,26 A	1,61 A	3,88 A	5,53 A	1,76 A	14,94 A
Doses de glyphosate (g e.a.)						
0,000	6,31 A	1,35 A	3,90 B	5,99 A	1,87 A	19,82 A
0,034	6,21 A	1,41 A	4,72 A	5,94 A	1,80 A	17,67 AB
0,144	5,90 A	1,21 B	3,83 B	4,84 B	1,14 B	14,64 BC
0,576	6,09 A	1,16 C	2,99 C	3,87 C	1,01 B	12,62 C
F fósforo	0,762 ^{NS}	184,305 ^{**}	1,307 ^{NS}	42,929 ^{**}	176,367 ^{**}	1,223 ^{NS}
f glyphosate	0,952 ^{NS}	18,563 ^{**}	32,549 ^{**}	57,378 ^{NS}	138,264 ^{NS}	8,006 ^{**}
F fósforo x glyphosate	2,200 ^{NS}	1,432 ^{NS}	9,112 ^{**}	5,369 ^{**}	28,293 ^{**}	1,498 ^{NS}
DMS² fósforo	0,5812	0,1129	0,4048	0,3833	0,1628	3,6830
DMS glyphosate	0,7468	0,1451	0,520	0,5609	0,1586	4,7320
CV³ (%)	7,10	5,56	7,85	5,01	6,54	7,04

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coefficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Interação entre fósforo e glyphosate foram significativas para os teores de Ca e Mg (Tabela 44). Os desdobramentos das interações indicaram que plantas nutridas com 1X e 1,5X de fósforo acumularam maiores teores de cálcio e magnésio. (Tabela 45).

Tabela 45. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre os teores radiculares de cálcio e magnésio.

Teor de cálcio (g kg⁻¹)				
	0,000	0,034	0,144	0,576
0,5X	4,47 Ba ¹	5,07 Ba	4,41 Ba	3,19 Bb
1X	6,41 Aa	6,24 Aa	5,48 Aa	4,44 Ab
1,5X	7,10 Aa	6,50 Aa	4,62 ABb	3,97 ABb
Teor de magnésio (g kg⁻¹)				
	0,000	0,034	0,144	0,576
0,5X	0,97 Ba	1,04 Ba	0,99 Ba	0,84 Cb
1X	2,20 Aa	2,14 Aa	1,10 Ab	1,13 Ab
1,5X	2,44 Aa	2,23 Aa	1,34 Ab	1,05 Ac

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Experimento IV - em câmara de crescimento - clone I144

Características fotossintéticas

Entre as concentrações de fósforo, os maiores teores relativos de clorofila **a** foram mensurados nas plantas cultivadas com 1,5X de fósforo às 144 e 360 HAA. Nessas avaliações, os teores de clorofila **a** foi 26,0 e 26,5% menor nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo quando comparada a das plantas cultivadas com 1,5X de fósforo. Antes da aplicação radicular de glyphosate não foram constatadas diferenças entre as concentrações de fósforo no teor de clorofila **a** (Tabela 46).

Às 0 HAA das doses de glyphosate não foram constatadas diferenças significativas entre os teores de clorofila **a** resultantes da dose do herbicida. Às 144 HAA, o teor de clorofila **a** foi reduzido em 15,9 e 19,7% após a aplicação de 0,288 e 0,576 g e.a. de glyphosate, respectivamente. Às 360 HAA essas reduções foram de 16,4 e 23,5% (Tabela 46).

Tabela 46. Teor relativo de clorofila **a** nas folhas do clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) às 0, 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila <i>a</i>			
	0 HAA	144 HAA	360 HAA
	----- unidades relativas -----		
Concentrações de fósforo			
0,5X	33,5 A ¹	27,0 C	26,6 C
1X	35,8 A	33,6 B	34,7 B
1,5X	37,9 A	36,5 A	36,2 A
Doses de glyphosate (g e.a.)			
0,000	34,9 A	34,5 A	35,2 A
0,017	34,9 A	34,0 A	34,8 A
0,034	34,6 A	34,1 A	34,4 AB
0,072	34,1 A	33,4 A	34,0 AB
0,144	33,7 A	33,6 A	32,9 B
0,288	34,0 A	29,0 B	29,4 C
0,576	33,8 A	27,7 B	26,9 D
F fósforo	4,570 ^{NS}	66,333**	492,440**
F glyphosate	1,090 ^{NS}	9,162**	78,771**
F fósforo x glyphosate	2,212 ^{NS}	2,810**	9,387**
DMS² fósforo	4,5107	2,0545	0,7991
DMS² glyphosate	1,9939	3,9982	1,5550
CV³ (%)	1,99	5,46	3,27

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A interação entre os fatores concentrações de fósforo e doses de glyphosate foi significativa às 144 e 360 HAA, indicando que, de modo geral, os maiores teores relativos de clorofila **a** foram constatados em plantas cultivadas com 1,5X e, em alguns casos, 1X de fósforo, e após a aplicação de doses de glyphosate inferiores a 0,072 g e.a. As maiores reduções ocorreram diante da aplicação radicular de 0,288 e/ou 0,576 g e.a. de glyphosate, tanto as 144 quanto às 360 HAA, e ocorreram nas plantas cultivadas com 1X e 1,5X de fósforo.

As 144 HAA, o teor relativo de clorofila **a** foi reduzido em 5,8% nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo; em 21,0% nas plantas cultivadas com 1X de fósforo,

e em 28,1% nas plantas cultivadas com 1,5X de fósforo (para tal, as médias da testemunha (ausência glyphosate) foram comparadas com as médias após a aplicação de 0,576 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate, para cada uma das concentrações de fósforo). Contudo, um comportamento diferente foi constatado às 360 HAA: o teor relativo de clorofila **a** foi reduzido em 15,2% nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo; em 19,7% nas plantas cultivadas com 1X de fósforo, e em 21,4% nas plantas cultivadas com 1,5X de fósforo (Tabela 47).

Tabela 47. Desdobramento da interação entre doses fósforo e concentrações de glyphosate sobre o teor relativo de clorofila **a** no clone I144 as 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila a às 144 HAA (unidades relativas)							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	27,4 Ba ¹	27,4 Ba	27,6 Ba	27,4 Ba	26,9 Ba	26,3 Ba	25,8 Ba
1X	37,1 Aa	36,4 Aa	35,3 Aa	34,3 Aab	31,8 Bab	30,1 Aab	29,3 Ab
1,5X	39,1 Aa	38,1 Aa	39,4 Aa	38,4 Aa	42,0 Aa	30,6 Ab	28,1 Ab
Teor relativo de clorofila a às 360 HAA (unidades relativas)							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	28,8 Ca	27,4 Cab	26,8 Cabc	26,4 Babc	26,8 Babc	25,8 Bbc	24,4 Bc
1X	37,0 Ba	37,0 Ba	37,1 Ba	37,2 Aa	35,9 Aa	31,1 Ab	29,7 Ac
1,5X	37,8 Aa	40,1 Aa	39,4 Aa	38,4 Aab	36,1 Ab	31,2 Ac	29,7 Ac

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Para os teores de clorofila **b**, o efeito isolado das concentrações de fósforo também resultou em menores valores nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo; as 144 e 360 HAA, esses teores foram maiores nas plantas cultivadas com a concentração de fósforo recomendada para o preparo da solução nutritiva (1X) em comparação as plantas cultivadas com 0,5X. Avaliando o efeito isolado das doses de glyphosate, às 144 e 360 HAA de 0,576 g e.a. de glyphosate, os teores relativos de clorofila **b** foram reduzidos em 55,2 e 49,0%, respectivamente (Tabela 48).

O desdobramento das interações para os efeitos das concentrações de fósforo e doses de glyphosate foi significativo às 144 e 360 HAA (Tabela 55). Às 144 HAA, os menores teores relativos de clorofila **b** foram mensurados nas plantas cultivadas com 0,5X após a aplicação de 0,144; 0,288 e 0,576 g e.a. de glyphosate.

Às 360 HAA de 0,576 g e.a. de glyphosate, o menor teor relativo de clorofila **b** foi mensurado nas plantas cultivadas com 0,5X. Nesse momento, essa característica foi reduzida em 57,8; 31,5 e 56,4% para as plantas cultivadas com 0,5X, 1X e 1,5X de fósforo, respectivamente (Tabela 49).

Tabela 48. Teor relativo de clorofila **b** nas folhas do clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) as 0, 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila <i>b</i>			
	0 HAA	144 HAA	360 HAA
----- unidades relativas -----			
Concentrações de fósforo			
0,5X	14,0 A ¹	10,7 C	10,4 C
1X	15,0 A	13,4 B	14,1 B
1,5X	15,6 A	14,7 A	14,8 A
Doses de glyphosate (g e.a.)			
0,000	15,0 A	16,1 A	15,7 A
0,017	14,2 A	16,2 A	15,5 A
0,034	15,6 A	15,2 AB	15,5 A
0,072	15,1 A	14,3 B	14,2 B
0,144	14,9 A	12,2 C	12,4 C
0,288	14,5 A	9,15 D	10,6 D
0,576	14,7 A	7,2 E	8,0 E
F fósforo	1,514 ^{NS}	177,059**	217,676**
F glyphosate	2,598 ^{NS}	224,719**	148,442**
F fósforo x glyphosate	1,454 ^{NS}	13,612**	24,147**
DMS² fósforo	1,6250	0,5216	0,5417
DMS² glyphosate	1,5162	1,0152	1,0542
CV³ (%)	5,59	5,36	5,49

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

As respostas do teor de clorofila total foram semelhantes às respostas dos teores individuais **a** e **b**. Dessa forma, não houve diferença significativa entre as concentrações de fósforo as 0 HAA. Já às 144 e 360 HAA, os menores teores de

clorofila total foram mensurados nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo, e essas reduções foram de 26,3 e 27,2%, respectivamente (Tabela 50).

Tabela 49. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre o teor relativo de clorofila **b** no clone I144 às 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor de clorofila <i>b</i> às 144 HAA (unidades relativas)							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	14,6 Ba ¹	14,6 Ba	14,0 Bab	12,6 Bb	6,9 Bc	6,3 Bc	6,4 Bc
1X	15,4 Ba	15,7 Ba	14,6 Ba	14,6 Aa	14,6 Aa	10,2 Ab	7,9 Ac
1,5X	18,3 Aa	18,3 Aa	17,1 Aab	15,8 Ab	15,2 Ab	10,9 Ac	8,2 Ad
Teor o de clorofila <i>b</i> às 360 HAA (unidades relativas)							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	14,7 Ba	13,6 Ba	14,0 Ba	10,9 Cb	6,9 Bc	7,0 Bc	6,2 Cd
1X	14,6 Ba	14,9 Ba	14,7 Ba	14,7 Ba	14,9 Aa	14,8 Aa	10,0 Ab
1,5X	17,7 Aa	17,7 Aa	17,7 Aa	17,0 Aa	15,4 Ab	14,8 Ab	7,7 Bc

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Após a aplicação radicular de glyphosate, as maiores reduções no teor relativo de clorofila total ocorreram após a aplicação das maiores doses: às 144 HAA as doses 0,288 e 0,576 g e.a. reduziram a clorofila total em 24,8 e 30,5%, respectivamente. Às 360 HAA, as reduções foram de 21,2 e 31,4%, respectivamente, para os mesmos tratamentos anteriormente citados (Tabela 50).

O desdobramento da interação indicou que o teor relativo de clorofila total foi, de modo geral, menor nas folhas das plantas do clone I144 cultivadas com 0,5X de fósforo. Às 144 HAA de 0,576 g e.a. de glyphosate, o teor de clorofila foi reduzido em 23,3% nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo quando comparadas as cultivadas com 1X de fósforo. Às 360 HAA, o teor relativo de clorofila total das plantas cultivadas com 0,5X, 1X e 1,5X foi reduzido em 36,6; 26,7 e 29,6%, respectivamente (comparação das médias das doses 0,000 e 0,576 g e.a. de glyphosate entre cada concentração de fósforo (Tabela 51).

Tabela 50. Teor relativo de clorofila total nas folhas do clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) às 0, 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Teor relativo de clorofila total			
	0 HAA	144 HAA	360 HAA
	----- unidades relativas -----		
Concentrações de fósforo			
0,5X	52,9 A ¹	37,7 C	37,1 C
1X	50,8 A	47,0 B	48,8 B
1,5X	53,5 A	51,2 A	51,0 A
Doses de glyphosate (g e.a.)			
0,000	49,9 A	50,7 A	50,9 A
0,017	49,2 A	50,2 A	50,3 AB
0,034	50,2 A	49,4 AB	49,9 AB
0,072	48,7 A	47,7 AB	48,2 B
0,144	48,6 A	45,8 B	45,4 C
0,288	48,6 A	38,1 C	40,1 D
0,576	48,5 A	35,2 C	34,9 E
F fósforo	3,908 ^{NS}	127,865**	581,249**
F glyphosate	2,633 ^{NS}	43,914**	163,187**
F fósforo x glyphosate	2,163 ^{NS}	4,025**	12,998**
DMS² fósforo	2,8272	2,093	1,0670
DMS² glyphosate	1,6098	4,0742	2,0765
CV³ (%)	2,24	4,15	3,11

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Tabela 51. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre o teor relativo de clorofila total no clone I144 as 144 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Desdobramento da interação no teor de clorofila total 144 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	42,0 Ba	42,1 Ba	41,6 Ca	40,0 Bab	33,8 Cbc	32,6 Bc	32,2 Ac
1X	52,2 Aa	52,5 Aa	50,0 Ba	48,9 Aa	46,5 Bab	41,5 Abc	37,5 Ac
1,5X	57,5 Aa	56,0 Aa	56,6 Aa	54,3 Aa	57,2 Aa	40,3 Ab	36,0 Ab
Desdobramento da interação no teor de clorofila total 360 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	43,5 Ca	41,0 Ca	40,9 Cab	37,3 Cbc	33,8 Bcd	32,8 Cd	30,6 Bd
1X	51,6 Ba	52,0 Ba	51,8 Ba	51,9 Ba	50,9 Aa	46,0 Ab	37,8 Ac
1,5X	57,5 Aa	57,9 Aa	51,7 Aa	55,5 Ca	51,5 Ab	41,4 Bc	36,4 Ad

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

A eficiência quântica do PSII não apresentou valores indicativos de estresses e, conseqüentemente, de danos no PSII até às 72 HAA (Tabela 52).

O efeito isolado das concentrações de glyphosate promoveram alterações na Fv/Fm às 96, 120, 144, 168 e 360 HAA. Nessas avaliações, o rendimento máximo do PSII foi superior nas plantas cultivadas com 1,5X de fósforo quando comparado ao das plantas cultivadas com 0,5X de fósforo (Tabela 53).

A aplicação radicular de 0,576 g e.a. de glyphosate ocasionou redução na Fv/Fm de 14,3% às 96 HAA. Já às 168 HAA, o PSII estava comprometido a partir da dose 0,072 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate, com reduções entre 8,6 e 78,0%. Às 360 HAA não foi mais possível quantificar a Fv/Fm após a aplicação das doses 0,144; 0,288 e 0,756 g e.a. de glyphosate, uma vez que as folhas encontravam-se desidratadas (Tabela 53).

Tabela 52. Eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) mensurada no clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) as 0, 1, 24, 48 e 72 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Eficiência quântica do fotossistema II					
	0 HAA	1 HAA	24 HAA	48 HAA	72 HAA
Concentrações de fósforo					
0,5X	0,822 A ¹	0,824 A	0,822 A	0,816 A	0,813 A
1X	0,822 A	0,820 A	0,823 A	0,819 A	0,813 A
1,5X	0,821 A	0,821 A	0,816 B	0,815 A	0,813 A
Doses de glyphosate (g e.a.)					
0,000	0,821 A	0,824 AB	0,824 A	0,825 A	0,824 A
0,017	0,824 A	0,825 AB	0,823 A	0,820 AB	0,817 AB
0,034	0,821 A	0,828 A	0,822 AB	0,816 AB	0,819 AB
0,072	0,822 A	0,818 AB	0,818 AB	0,819 AB	0,815 AB
0,144	0,821 A	0,819 AB	0,820 AB	0,816 AB	0,818 AB
0,288	0,824 A	0,820 AB	0,812 B	0,812 B	0,811 BC
0,576	0,822 A	0,818 B	0,822 AB	0,815 B	0,804 C
F fósforo	0,051 ^{NS}	1,855 ^{NS}	6,450 ^{**}	1,843 ^{NS}	3,686 ^{NS}
F glyphosate	0,227 ^{NS}	3,602 [*]	3,519 [*]	3,564 ^{NS}	10,155 ^{**}
F fósforo x glyphosate	0,477 ^{NS}	1,186 ^{NS}	1,253 ^{NS}	0,947 ^{NS}	1,722 [*]
DMS ² fósforo	0,0115	0,0047	0,0049	0,0053	0,0047
DMS glyphosate	0,0114	0,0093	0,0097	0,0104	0,0093
CV ³ (%)	0,74	0,61	0,64	0,68	0,61

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. ^{*}Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{**}Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A interação entre os fatores foi significativa entre às 72 e 360 HAA, e seu desdobramento indicou que a redução na Fv/Fm foi maior nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo. Às 120 HAA de 0,576 g e.a. de glyphosate, o rendimento do PSII das plantas cultivadas com 0,5X de fósforo foi reduzido em 71,8%; o rendimento do PSII das plantas cultivadas com 1X de fósforo foi reduzido em 16,2% e o rendimento do PSII das plantas cultivadas com 1,5X de fósforo foi reduzido em apenas 5,8% (Tabela 54).

Tabela 53. Eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) mensurada no clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) as 96, 120, 144, 168 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Eficiência quântica do fotossistema II					
	96 HAA	120 HAA	144 HAA	168 HAA	360 HAA
Concentrações de fósforo					
0,5X	0,773 B	0,705 C	0,470 C	0,454 B	0,449 B
1X	0,790 AB	0,785 B	0,751 B	0,468 B	0,452 B
1,5X	0,804 A	0,808 A	0,789 A	0,673 A	0,466 A
Doses de glyphosate (g e.a.)					
0,000	0,825 A	0,821 A	0,824 A	0,821 A	0,822 A
0,017	0,818 A	0,815 A	0,821 A	0,819 A	0,818 A
0,034	0,818 A	0,817 A	0,814 A	0,817 A	0,813 A
0,072	0,804 AB	0,803 AB	0,791 A	0,750 B	0,741 B
0,144	0,775 AB	0,794 B	0,516 B	0,275 C	0,000 C
0,288	0,760 B	0,742 C	0,496 B	0,125 D	0,000 C
0,576	0,707 C	0,564 D	0,462 C	0,108 D	0,000 C
F fósforo	7,103**	198,863*	635,623**	601,474**	41,877**
F glyphosate	17,080**	346,953**	291,346**	2490,254**	4146,331**
F fósforo x glyphosate	1,538*	166,919**	156,306**	151,369**	36,930**
DMS² fósforo	0,0234	0,0115	0,0246	0,0163	0,0049
DMS² glyphosate	0,0462	0,0226	0,0486	0,0321	0,0096
CV³ (%)	3,11	1,58	2,86	3,23	1,13

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

As 168 HAA de 0,144 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate, por exemplo, as folhas medianas das plantas cultivadas com 1,5X de fósforo apresentaram Fv/Fm de 0,750 e, portanto, estavam no limiar do considerado “normal”. Já as cultivadas com 1X praticamente não apresentavam mais atividades no PSII (0,075), e as cultivadas com 0,5X apresentaram Fv/Fm igual a 0.

Tabela 54. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre a eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) nas folhas do clone I144 às 72, 96, 120, 168 e 360 horas após a aplicação (HAA) das doses de glyphosate.

Eficiência quântica do fotossistema II às 72 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	0,823 Aa ¹	0,817 Aa	0,821 Aa	0,817 Aa	0,815 Aab	0,800 Bbc	0,799 Bc
1X	0,823 Aa	0,818 Aa	0,817 Aa	0,815 Aa	0,821 Aa	0,816 Aa	0,800 ABb
1,5X	0,827 Aa	0,820 Aa	0,819 Aa	0,813 Aa	0,817 Aa	0,817 Aa	0,812 Aa
Eficiência quântica do fotossistema II às 96 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	0,828 Aa	0,817 Aa	0,823 Aa	0,797 Ab	0,743 Ab	0,750 Ab	0,649 Ab
1X	0,825 Aa	0,826 Aa	0,817 Aa	0,805 Aa	0,783 Ab	0,776 Ab	0,701 Ab
1,5X	0,823 Aa	0,812 Aa	0,816 Aa	0,810 Aa	0,801 Aa	0,800 Aa	0,772 Ab
Eficiência quântica do fotossistema II às 120 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	0,821 Aa	0,814 Aa	0,815 Aa	0,789 Ab	0,772 Ab	0,699 Bb	0,231 Cc
1X	0,818 Aa	0,816 Aa	0,817 Aa	0,801 Aab	0,807 Aab	0,757 Ab	0,685 Bc
1,5X	0,825 Aa	0,817 Aa	0,819 Aa	0,818 Aa	0,805 Aab	0,801 Aab	0,777 Ab
Eficiência quântica do fotossistema II às 168 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	0,821 Aa	0,815 Aa	0,814 Aa	0,728 Bb	0,000 Cc	0,000 Bc	0,000 Bc
1X	0,822 Aa	0,818 Aa	0,818 Aa	0,744 Aa	0,075 Bb	0,000 Bc	0,000 Bc
1,5X	0,822 Aa	0,824 Aa	0,821 Aa	0,800 Aa	0,750 Ab	0,375 Ac	0,325 Ac
Eficiência quântica do fotossistema II às 360 HAA							
	0,000	0,017	0,034	0,072	0,144	0,288	0,576
0,5X	0,823 Aa	0,816 Aa	0,811 Aa	0,699 Cb	0,000 Ac	0,000 Ac	0,000 Ac
1X	0,823 Aa	0,817 Aa	0,817 Aa	0,716 Bb	0,000 Ac	0,000 Ac	0,000 Ac
1,5X	0,820 Aa	0,820 Aa	0,816 Aa	0,808 Ab	0,000 Ac	0,000 Ac	0,000 Ac

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico

Os teores de glyphosate e ácido chiquímico não foram alterados pelas concentrações de fósforo utilizadas no cultivo das plantas de eucalipto. Já os teores de AMPA maiores nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo, quando comparados aos teores de AMPA nas plantas cultivadas com 1X e 1,5X. Interações entre

concentrações de fósforo e doses de glyphosate foram significativas para os teores de AMPA e ácido chiquímico (Tabela 55).

Tabela 55. Teores de glyphosate, ácido aminometilfosfônico (AMPA) e ácido chiquímico ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido foliar seco) no clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 15 após a aplicação das doses de glyphosate.

Teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico			
	glyphosate	AMPA	ácido chiquímico
	----- $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido foliar seco -----		
Concentrações de fósforo			
0,5X	5,29 A ¹	0,26 A	1144,25 A
1X	5,24 A	0,18 B	1117,75 A
1,5X	5,12 A	0,15 B	1181,79 A
Doses de glyphosate (g e.a.)			
0,000	0,00 D	0,00 C	373,38 D
0,034	0,62 C	0,21 B	992,05 C
0,144	5,08 B	0,28 A	1525,72 B
0,576	15,17 A	0,31 A	1700,55 A
F fósforo	0,719 ^{NS}	34,264 ^{**}	1,788 ^{NS}
f glyphosate	3172,806 ^{**}	173,215 ^{**}	463,025 ^{**}
F fósforo x glyphosate	1,546 ^{NS}	29,096 ^{**}	2,594 [*]
DMS ² fósforo	0,3808	0,0331	85,0137
DMS glyphosate	0,4856	0,0422	108,4292
CV ³ (%)	7,15	15,96	7,26

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. ^{*}Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{**}Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A partir do desdobramento da interação entre os fatores foi possível constatar que após a aplicação de 0,034 e 0,144 g e.a. de glyphosate, os maiores teores de AMPA foram quantificados nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo. Contudo, após a aplicação da maior dose de glyphosate, a situação se inverteu: as plantas cultivadas com 1,5X de fósforo acumularam mais de AMPA quando comparadas as plantas cultivadas com 0,5X e 1X de fósforo (Tabela 56).

Tabela 56. Desdobramento da interação entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate sobre os teores de ácido aminometilfosfônico (AMPA) e ácido chiquímico em folhas de eucalipto do clone I144.

Teor de AMPA ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido foliar seco)				
	0,000	0,034	0,144	0,576
0,5X	0,00 Ad ¹	0,32 Ac	0,50 Ab	0,23 Ba
1X	0,00 Ac	0,19 Bb	0,28 Ba	0,26 Ba
1,5X	0,00 Ac	0,12 Cb	0,16 Cb	0,35 Aa
Teor de ácido chiquímico ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido foliar seco)				
	0,000	0,034	0,144	0,576
0,5X	482,00 Ad	961,60 Ac	1458,33 Ab	1675,00 Aa
1X	244,66 Bc	1023,00 Ab	1508,40 Aa	1693,10 Aa
1,5X	393,50 ABc	991,50 Ab	1610,50 Aa	1731,60 Aa

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

Os maiores teores de ácido chiquímico foram mensurados após a aplicação radicular de 0,144 g e.a. de glyphosate, nas plantas cultivadas com 1X e 1,5X de fósforo, e após a aplicação de 0,576 g e.a. de glyphosate, independentemente da concentração de fósforo utilizada para nutrição das plantas. Já os menores teores desse composto foram quantificados nas testemunhas sem aplicação de glyphosate cultivadas com 1X e 1,5X de fósforo (Tabela 56).

Nutrição

A análise dos teores nutricionais foliares do clone I144 indicou diferenças entre as concentrações de fósforo para todos os nutrientes. Os teores de N, P, K, Ca e Mg foram acumulados em maior quantidade nas plantas cultivadas com 1X ou 1,5X de fósforo. O efeito isolado das doses de glyphosate não alterou o teor foliar dos nutrientes (Tabela 57).

Tabela 57. Teores foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) no clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 15 dias após a aplicação das doses de glyphosate.

Teores nutricionais foliares					
	N	P	K	Ca	Mg
	----- g kg ⁻¹ -----				
Concentrações de fósforo					
0,5X	24,60 B ¹	1,41 B	11,54 B	5,57 B	2,75 B
1X	25,58 B	2,28 A	11,94 AB	7,18 A	3,41 A
1,5X	29,65 A	2,05 A	12,37 A	6,68 A	3,16 A
Doses de glyphosate (g e.a. ha⁻¹)					
0,000	26,06 A	1,71 A	12,10 A	6,97 A	3,39 A
0,034	26,85 A	1,81 A	11,61 A	6,48 A	3,12 A
0,144	27,40 A	2,03 A	12,00 A	6,32 A	3,09 A
0,576	26,14 A	2,10 A	12,10 A	6,14 A	3,09 A
F fósforo	52,224**	26,063**	4,154*	15,724**	1,932 ^{NS}
F glyphosate	1,539 ^{NS}	3,432 ^{NS}	0,940 ^{NS}	2,194 ^{NS}	1,779 ^{NS}
F fósforo x glyphosate	3,580 ^{NS}	1,187 ^{NS}	0,929 ^{NS}	1,434 ^{NS}	0,540 ^{NS}
DMS² fósforo	1,399	0,3206	0,7736	0,7876	0,4007
DMS² glyphosate	1,7986	0,4120	0,0039	1,0119	0,4634
CV(%)	3,94	12,52	4,83	9,11	12,42

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coefficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Interações estatisticamente significativas entre fósforo e glyphosate não foram constatadas (Tabela 57).

Já para os teores de nutrientes nas raízes, foram constatadas diferenças entre as concentrações de fósforo para todos os nutrientes, com exceção do magnésio. Os maiores teores nutricionais foram quantificados nas plantas cultivadas com 1X e 1,5X. A comparação dos teores quantificados nas plantas cultivadas com 0,5X e 1,5X de fósforo indicou reduções de 41,3% nos teores de N; 14,0% nos teores de P; 30,4% nos teores de K e 34,3% nos teores de B (Tabela 58).

Tabela 58. Teores radiculares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e boro (B) no clone I144 cultivado com as concentrações de fósforo 0,5X; 1X e 1,5X (em que X correspondeu à concentração de fósforo recomendada pela solução) aos 15 dias após a aplicação das doses de glyphosate.

Teor nutricional radicular						
	N	P	K	Ca	Mg	B
	g kg ⁻¹			mg kg ⁻¹		
Concentrações de fósforo						
0,5X	5,83 B ¹	1,72 B	4,73 B	5,39 B	1,94 A	16,31 B
1X	8,57 A	2,07 A	6,57 A	7,17 A	2,21 A	18,88 B
1,5X	9,18 A	2,00 A	6,80 A	7,36 A	2,08 A	24,89 A
Doses de glyphosate (g e.a.)						
0,000	8,17 A	1,93 A	6,25 A	6,71 A	2,76 A	24,88 A
0,034	7,29 A	2,01 A	5,17 A	6,65 A	1,94 B	25,43 A
0,144	7,66 A	1,89 A	5,91 A	6,31 A	1,74 B	16,74 B
0,576	8,32 A	1,85 A	6,27 A	6,24 A	1,85 B	12,41 C
F fósforo	47,663**	5,006*	53,968*	33,060**	1,540 ^{NS}	52,649**
F glyphosate	2,543 ^{NS}	0,538 ^{NS}	2,367 ^{NS}	1,271 ^{NS}	13,782*	41,436**
F fósforo x glyphosate	1,199*	0,499 ^{NS}	3,620 ^{NS}	1,548 ^{NS}	1,129 ^{NS}	3,299 ^{NS}
DMS² fósforo	0,9736	0,3042	0,5839	0,6817	0,4103	6,4208
DMS² glyphosate	1,2509	0,3909	0,7502	0,8758	0,5271	6,4208
CV³ (%)	9,28	11,84	7,25	8,54	10,70	8,62

¹Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ²Diferença mínima significativa entre as médias. ³Coeficiente de variação. ^{NS}Não significativo pelo Teste de Tukey. *Significativo pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Já o efeito isolado das doses de glyphosate não alterou os teores de N, P, K e Ca. Contudo, a aplicação de glyphosate reduziu os teores de magnésio e boro em 18,5 e 31,3%, respectivamente (comparação das doses 0,000 e 0,576 g e.a. de glyphosate). A interação entre os fatores concentrações de fósforo e doses glyphosate foi significativa apenas para N (Tabela 59).

Os maiores teores de nitrogênio foram quantificados nas plantas cultivadas com as maiores concentrações de fósforo e, nessas plantas, a aplicação das doses de glyphosate não alterou os teores de nitrogênio (Tabela 59).

Tabela 60. Desdobramento da interação entre fósforo e glyphosate sobre os teores radiculares de nitrogênio.

	Teor de nitrogênio (g kg ⁻¹)			
	0,000	0,034	0,144	0,576
0,5X	6,37 Ba ¹	5,68 Ba	5,51 Bb	5,78 Bb
1X	8,77 Aab	7,62 Ab	8,00 Aab	9,30 Aa
1,5X	9,38 Aa	9,57 Aa	9,46 Aa	9,90 Aa

¹Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas (colunas) comparam doses de fósforo e letras minúsculas (linhas) doses de glyphosate.

DISCUSSÃO

Características fotossintéticas

Para o experimento em casa de vegetação (utilizando areia como substrato) com o clone GG100 foram observadas diferenças no teor relativo de clorofila **a**, **b** e total entre as concentrações de fósforo antes mesmo da pulverização de glyphosate, e o aumento do teor de clorofila total ocorreu em função do aumento do teor de fósforo presente na solução nutritiva utilizada para suprir a demanda nutricional das plantas. Já para o clone I144 (também em casa de vegetação) não foram constatadas diferenças nos teores de clorofila total antes da pulverização de glyphosate, indicando que as concentrações de fósforo não afetaram essa característica. Contudo, nas avaliações de 3, 7 e 15 DAA de glyphosate, os menores teores de clorofila total foram mensurados nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo.

O fósforo é um constituinte de compostos armazenadores de alta energia, como o ATP, e é um dos “responsáveis” pelo bom funcionamento do processo fotossintético, especificamente, da cadeia de transporte de elétrons (NAIFF, 2007). Embora a relação entre fósforo e clorofila não seja direta, reduções nos teores de fósforo possivelmente acarretam em menores teores de clorofila.

Para os experimento em casa de vegetação, os efeitos isolados do glyphosate iniciaram-se aos 7 DAA do herbicida para o clone GG100; enquanto para o clone I144 iniciaram-se já 1 DAA. Para os experimentos em câmara de crescimento, os efeitos isolados do glyphosate iniciaram-se as 144 HAA do herbicida para ambos os

clones (essa foi a primeira avaliação realizada após a aplicação radicular do herbicida, então reduções no teor de clorofila podem ter sido iniciadas antes).

A redução da síntese de clorofila é um dos efeitos do glyphosate (MARÍA et al., 2005; AHSAN et al., 2008). O glyphosate reduz os teores de clorofila por inibir a síntese de glutamato, composto necessário para a síntese do ácido aminolevulinato, precursor da clorofila (SIQUEIRA et al., 1999). Alguns pesquisadores ainda ressaltam que a clorofila pode ser fotodestruída devido a inibição da síntese de carotenoides pelo glyphosate (FUCHS et al., 2002).

Já para os experimentos em câmara de crescimento (sistema hidropônico) foram avaliados os teores de clorofila **a**, **b** e total, e mais uma vez, foi evidenciado o comportamento diferencial entre os clones.

A clorofila **a** é o pigmento utilizado para realizar a fase fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto a clorofila **b**, junto aos demais pigmentos, auxilia na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo considerada um pigmento acessório. A estrutura das clorofilas **a** e **b** é basicamente a mesma: compõem-se da porção porfirina, constituída de quatro anéis de pirrol ligados por pontes de carbono-hidrogênio. O íon metálico magnésio está inserido no centro da porfirina (TANAKA; TANAKA, 2007).

Nesses experimentos, foi possível observar que a redução dos teores relativos de clorofila **b** foi bem mais acentuada que a redução nos teores relativos de clorofila **a**. Uma vez que a clorofila **b** é um pigmento acessório, diante da degradação de clorofila **a**, a clorofila **b** pode ter sido convertida em clorofila **a**. Esse processo pode ocorrer com a ação de uma enzima chamada clorofila **a** oxigenase, que catalisa a conversão do grupo metil ao grupo aldeído (XU et al., 2001).

A redução no teor de clorofila devido à aplicação do glyphosate também foi constatada em milho, cevada e tabaco (COLE, 1985), cana-de-açúcar (MESCHÉDE et al., 2007) e sorgo (MAGALHÃES et al., 2001).

Após a clorofila, avaliar a eficiência quântica do PSII é essencial para a compreensão dos efeitos de fósforo e glyphosate no processo fotossintético. Durante a fase de transporte de elétrons da fotossíntese, a luz é absorvida por pigmentos do complexo antena, que, ao excitarem os elétrons, transferem energia para os centros de reação dos fotossistemas II e I (YOUNG; FRANK, 1996). O excesso de energia

pode ser dissipado na forma de fluorescência (KRAUSE; WINTER, 1996), e essa é uma das maneiras de monitorar a transferência de elétrons entre os fotossistemas (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

A fluorescência variável, ou F_v , representa o fluxo de elétrons do centro de reação do PSII (P680) até a plastoquinona (PQH₂). Já a fluorescência máxima, ou F_m , representa a completa redução da quinona A (QA) a partir da incidência de um pulso de luz no centro de reação QA (KRAUSE; WEISS, 1991). Assim, a F_v/F_m é a eficiência quântica do fotossistema II, e fornece uma indicação da capacidade fotossintética nas plantas e da extensão de estresses devido a fatores bióticos ou abióticos, como a deficiência hídrica (CRUZ et al., 2009), temperatura (OLIVEIRA et al., 2002), radiação (MAZZA et al., 2000) e herbicidas (CATUNDA et al., 2005; ARALDI et al., 2011).

Quando uma planta está com seu aparelho fotossintético intacto, a razão F_v/F_m deve variar entre 0,850 e 0,750 (MAXWELL; JOHNSON, 2000; LICHTENTHALER et al., 2005). Embora essa seja uma “informação geral” e não específica para eucalipto, tanto nos experimentos em casa de vegetação quanto para os experimentos em câmara de crescimento, valores entre 0,810 e 0,831 foram mensurados nas plantas, independentemente da concentração de fósforo, antes da pulverização ou aplicação de glyphosate. Valores semelhantes também foram encontrados para a F_v/F_m de *Eucalyptus grandis* por Silva et al. (2009).

Para os experimentos em casa de vegetação e câmara de crescimento não foram constatadas alterações na F_v/F_m em função das concentrações de fósforo antes da pulverização ou aplicação radicular de glyphosate (0 DAA ou 0 HAA) para os clones GG100 ou I144. Isso demonstrou que o uso de 0,5X; 1X ou 1,5X de fósforo no cultivo das plantas não acarretou em estresses oxidativos que ocasionassem danos fotoinibitórios nos centros de reação do PSII.

Após a pulverização foliar ou aplicação radicular de glyphosate, diferenças entre as concentrações de fósforo foram constatadas. A deficiência de fósforo também reduziu significativamente a F_v/F_m de plantas jovens de cafeeiro, levando a ocorrência de danos fotoquímicos (SILVA et al., 2010). Segundo esses pesquisadores, o dano pode ter sido consequência direta da ausência de fósforo (na pesquisa acima citada, fósforo não foi fornecido na adubação de plantio) ou também

do excesso de energia no PS II, uma vez que essas plantas apresentavam redução significativa da assimilação de CO₂.

Atentando-se ao efeito isolado de glyphosate, reduções indicativas de comprometimento do PSII (valores inferiores a 0,750) ocorreram a partir de 1 DAA (clone GG100) e aos 3 DAA (clone I144) para os experimentos em casa de vegetação. Para o experimento em câmara de crescimento com o clone GG100, essas reduções ocorreram às 360 HAA nas folhas basais, às 144 HAA nas folhas medianas, e às 120 HAA nas folhas novas. Para o clone I144, o início do comprometimento do rendimento do PSII foi observado às 144 HAA nas folhas basais, as 120 HAA nas folhas medianas e as 96 HAA nas folhas novas.

O glyphosate inibe a via do chiquimato e, teoricamente, a inativação da via do chiquimato tende a estimular o acúmulo de triose-fosfato, produzido no ciclo de Calvin-Benson, o que aumentaria a atividade de oxidação da Rubisco, desorganizando o aparelho fotossintético (MARÍA et al., 2005; AHSAN et al., 2008). Contudo, os processos que acarretam em alterações na atividade fotossintética de plantas submetidas ao glyphosate ainda não são totalmente conhecidos. Alterações na taxa de fixação de carbono, no teor de ácido chiquímico e na translocação de carboidratos podem influenciar na atividade do PSII (CEDERGREEN; OLESEN, 2010).

Para o clone I144, foi possível observar que alterações no aparato fotossintético ocorreram algumas horas antes do constatado para o clone GG100. Esse fato pode ser explicado pela tolerância diferencial de clones de eucalipto a glyphosate, que pode estar relacionada a diversos mecanismos, como retenção foliar, absorção e translocação de glyphosate; quantidade de cera nas folhas; capacidade de metabolização das plantas, entre outros. Os clones avaliados nessa pesquisa foram previamente estudados por Carvalho et al. (2015), que concluíram que o clone I144 tem maior sensibilidade ao glyphosate quando comparado ao clone GG100.

Alterações na fluorescência foram observadas em plantas tratadas com glyphosate por diversos pesquisadores e em várias culturas (IRELAND et al., 1986; CORREA; ALVES, 2010; ZOBIOLE et al., 2011). Danos no aparato fotossintético de *E. grandis* foram observados por após a pulverização de glyphosate (1440 g de i.a.

ha⁻¹), por Silva et al. (2009), quando aos 4 DAA a Fv/Fm já apresentava valores inferiores a 0,750; aos 7 DAA esses pesquisadores não puderam mais realizar medições da fluorescência devido a desidratação das folhas.

Uma vez que a fluorescência da clorofila é uma medida que mostra o grau de eficiência com que as plantas estão realizando a fotossíntese, pode ser usada como uma ferramenta para estudar diversos aspectos desse processo, pois reflete a mudança na membrana e na organização do tilacóide (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Pelos resultados apresentados nessa pesquisa, o glyphosate afetou diretamente a estrutura do cloroplasto, acarretando da redução significativa Fv/Fm nos clones GG100 e I144.

Para Horton et al. (1996), diminuições em Fv/Fm estão associadas com o aumento da excitação de energia no fotossistema II, e essa diminuição é geralmente considerada um dos indicativos de baixo fluxo no transporte de elétrons, o que reflete em uma menor taxa fotossintética.

As taxas fotossintéticas e a condutância estomática foram mensuradas apenas para as plantas do clone GG100 cultivadas em câmara de crescimento e em sistema hidropônico. A taxa de fotossíntese foi diferenciada, em função das concentrações de fósforo, apenas às 96 e 120 HAA de glyphosate.

A baixa disponibilidade de fósforo (ausência de adição de fósforo nas adubações de plantio) também reduziu a atividade fotoquímica em *Coffea arabica* (SILVA et al., 2010). Como já apresentado anteriormente, o baixo teor de fósforo possivelmente acarretou em baixa ciclagem de fósforo entre o citoplasma e o estroma (HENDRICKSON et al., 2004; SANTOS et al., 2006), redução da produção de ATP e NADPH; da carboxilação/regeneração de RuBP (SHUBHRA et al., 2004), comprometimento da expressão de genes relacionados à fotossíntese, menor condutância do mesófilo (LAWLOR; CORNIC, 2002) e fechamento estomático (FLÜGGE et al., 2003).

A aplicação de glyphosate começou a reduzir a taxa fotossintética às 96 HAA, e essa redução foi incrementada em função do aumento da dose do herbicida e do tempo decorrido após a aplicação. A maior dose de glyphosate reduziu a taxa fotossintética em 92,1; 90,5 e 99,0% às 120, 144 e 168 HAA, respectivamente.

A redução das taxas de fotossíntese após a pulverização de glyphosate foi relatada em plantas de eucalipto (MACHADO et al., 2010); cevada (ZOBIOLE et al., 2010a, b, c); soja RR (ZOBIOLE et al., 2011); na planta daninha *Conyza sumatrensis* (SANTOS et al., 2014), dentre outras.

A condutância estomática não foi alterada pelas concentrações de fósforo utilizadas na nutrição das plantas. Após a aplicação de glyphosate, as primeiras alterações na condutância estomática foram constatadas as 120 HAA, e ocorreram apenas para aplicação das maiores doses de glyphosate. Essas reduções foram superiores a 50,0%.

A condutância estomática é o mecanismo fisiológico que as plantas terrestres vasculares possuem para o controle da transpiração (MESSINGER et al., 2006). A epiderme das folhas encontra-se envolvida por uma cutícula relativamente impermeável, e contém quantidade variável de estômatos, que mediante a regulação da condutância estomática controlam a transpiração da folha. Esse processo pode ser influenciado pela luz, pela concentração de gás carbônico atmosférico, pela umidade e temperatura. A condutância estomática é proporcional à transpiração, à fotossíntese líquida e ao potencial da água na folha (NAVES-BARBIERO et al., 2000).

Uma vez que o experimento foi conduzido em câmara de crescimento (com umidade e temperatura controladas) e em solução nutritiva (portanto, sem restrição hídrica), as plantas possivelmente não necessitaram promover grandes alterações em sua condutância estomática para controlar a transpiração. No entanto, após a aplicação de glyphosate, alterações ocorreram em resposta aos efeitos diretos e indiretos desse herbicida, que já haviam alterado previamente a fotossíntese. Dessa forma, o declínio das taxas fotossintéticas se iniciaram as 96 HAA e provavelmente promoveram alterações que acarretaram na redução da condutância estomática, que se iniciou às 120 HAA de glyphosate.

O decréscimo acentuado da taxa de fotossíntese e da condutância estomática em função do aumento das doses do glyphosate foi relatado em plantas de quatro clones de eucalipto (pertencentes as espécies *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*) por Machado et al. (2010).

Teores de lipoperóxidos

Um dos metabólitos resultantes da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA). Nessa pesquisa, os teores de MDA (teores de lipoperóxidos) foram quantificados apenas para os experimentos em casa de vegetação (cultivo em areia com pulverização foliar de glyphosate).

As concentrações de fósforo não influenciaram os teores de MDA nos clones GG100 e I144, mas a pulverização de glyphosate acarretou no aumento dos teores de MDA, indicando que glyphosate promoveu a peroxidação lipídica, danificando e destruindo membranas celulares.

Para o clone GG100 maiores teores de MDA ocorreram apenas para a pulverização de 360 g e.a. ha⁻¹, enquanto para o clone I144 esse aumento foi constatado a partir de 180 g e.a. ha⁻¹.

Após a pulverização de glyphosate, a produção dos pigmentos vitais para o funcionamento correto da fotossíntese (clorofilas e carotenoides) é alterada, como já descrito anteriormente. Isso promove uma grande desorganização no aparato fotossintético e, conseqüentemente, o direcionamento inadequado dos elétrons pode acarretar na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CORBETT, 1984; FEDTKE, 1982). Todas essas moléculas altamente reativas irão reagir com os lipídios formadores das membranas, promovendo a peroxidação lipídica, que, além de formar novos radicais lipídicos, danificam irreversivelmente as membranas celulares (HESS, 2000; FLECK; VIDAL, 2001).

As plantas contam com algumas estratégias para lidar com a formação de EROs e o estresse oxidativo: 1- adaptações anatômicas, como movimento ou enrolamento das folhas; 2- mecanismos moleculares que rearranjam o aparelho fotossintético (MITTLER, 2002; LEDFORD; NIYOGI, 2005); 3- ativação de um grupo de enzimas chamadas de oxidases alternativas, que, basicamente, desviam elétrons da cadeia de transporte de elétrons para reduzir o oxigênio à água, e evitar a formação de EROs (MITTLER, 2002; LEDFORD; NIYOGI, 2005); e 4- formação de compostos antioxidantes.

Teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico

Para o clone GG100, os maiores teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico foram quantificados nas plantas com menor concentração de fósforo. Já para o clone I144, os teores de glyphosate e ácido chiquímico no tecido foliar não foram alterados pelas concentrações de fósforo. Os maiores teores de AMPA também foram quantificados nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo.

Os teores dos três compostos aumentaram com o aumento da dose de glyphosate aplicada. Nas maiores doses, a concentração de solutos foi maior, e o aumento da concentração externa de glyphosate possivelmente provocou o aumento da taxa de absorção e, conseqüentemente, o aumento da ação do herbicida, acarretando em maiores níveis de ácido chiquímico.

O AMPA, composto derivado da metabolização do glyphosate, foi constatado em maior quantidade nas plantas com as menores concentrações de fósforo no clone GG100. Possivelmente, essas plantas estavam mais equilibradas nutricionalmente, degradando glyphosate de modo mais eficiente. Para o clone I144, que apresentou maior eficiência no uso de fósforo, as concentrações desse nutriente não alteraram a metabolização do glyphosate e, conseqüentemente, o teor de AMPA. Outra hipótese é a de que esses clones possuem capacidades de degradação de glyphosate em AMPA diferenciadas, o que deve ser considerado, uma vez que, como já citado anteriormente, esses clones possuem tolerância diferente ao glyphosate. No entanto, a rota de degradação do glyphosate nas plantas ainda não é totalmente compreendida.

Alguns pesquisadores ainda têm atribuído à redução do acúmulo de massa de espécies pulverizadas por glyphosate ao acúmulo do ácido aminometilfosfônico (AMPA) (REDDY et al., 2004). Nessa pesquisa, as plantas cultivadas com 0,5X de fósforo apresentaram os maiores teores de AMPA e os menores acúmulos de massa seca de folhas e caule.

O glyphosate atua diretamente na via do chiquimato. Assim, o efeito mais rápido e drástico da aplicação de glyphosate em plantas sensíveis é o acúmulo de chiquimato ou ácido chiquímico (AMRHEIN et al., 1980; LYDON; DUKE, 1988). Nessa pesquisa, os maiores teores de ácido chiquímico foram quantificados após a

aplicação das maiores doses de glyphosate, corroborando o fato já evidenciado na literatura.

Matallo et al. (2009) também constataram que as plantas que receberam aplicação de glyphosate apresentaram sempre maiores concentrações de ácido chiquímico que as plantas testemunhas. Níveis elevados de ácido chiquímico, detectados a partir de aplicações de glyphosate, foram observados em diversas culturas, como por exemplo, algodão (PLINE et al., 2002); e também em plantas daninhas, como *Conyza canadensis* (MUELLER et al., 2003; KOGER et al., 2005).

Nutrição

De um modo bem geral, as maiores doses de fósforo promoveram o maior acúmulo de nutrientes nas plantas de eucalipto; enquanto a menores dose de fosforo acarretou nos menores teores nutricionais.

A participação do fósforo em compostos armazenadores de alta energia, como o ATP, está diretamente relacionada com a absorção de nutrientes do solo (NAIFF, 2007). Dessa forma, nas plantas nutridas com as maiores concentrações de fósforo, o acúmulo de todos os nutrientes foi maior.

A pulverização de glyphosate (experimentos em casa de vegetação) acarretou na redução do teor de nitrogênio foliar ($180 \text{ g e.a. ha}^{-1}$) no clone GG100. A aplicação radicular de glyphosate (experimentos em câmara de crescimento) resultou na redução dos teores de cálcio e magnésio nas folhas das plantas do clone GG100 e na redução dos teores radiculares de todos os nutrientes, exceto nitrogênio. Já para o clone I144 não foram constatadas alterações nos teores foliares após a aplicação de glyphosate; no entanto, os teores radiculares de cálcio, magnésio e boro foram reduzidos.

Possivelmente, a redução nos teores de nutrientes após a aplicação de glyphosate, principalmente em doses mais altas, ocorreu em função da menor absorção dos nutrientes pelas raízes e/ou de uma possível complexação dos nutrientes com a molécula de glyphosate na solução nutritiva (nos experimentos em sistema hidropônico, o glyphosate foi adicionado diretamente à solução nutritiva) ou

dentro da planta, reduzindo os teores de nutrientes radiculares e, conseqüentemente, comprometendo os teores foliares.

Após a aplicação de glyphosate, uma alteração no balanço de cargas entre as raízes e a solução nutritiva pode ter ocorrido, na capacidade de troca catiônica das raízes, acarretando alteração no metabolismo da planta e promovendo a redução da absorção dos nutrientes. Assim, além dos efeitos supracitados do glyphosate no processo fotossintético, o comprometimento da absorção de nutrientes também pode ter limitado o crescimento da planta em função da escassez de nutrientes.

O desbalanço de cargas no sistema radicular poderá ainda reduzir o crescimento do sistema radicular e, conseqüentemente, comprometer ainda mais a absorção - especialmente dos nutrientes que são pouco móveis no solo, como P e K, cuja absorção ocorre principalmente por difusão; além de cálcio e magnésio, cuja participação da interceptação radicular é importante no processo de absorção. Além disso, sabe-se que a absorção de nutrientes por fluxo de massa é regulada pela abertura estomática, e na literatura a redução da condutância estomática já foi relatada para glyphosate, comprometendo a absorção de nitrogênio, cálcio e magnésio (nutrientes absorvidos predominantemente por fluxo de massa).

Dessa forma, o desbalanço nutricional das plantas já foi bastante relado na literatura com um dos efeitos do herbicida glyphosate (ZOBIOLE et al., 2009; SERRA et al., 2011). Por exemplo, a pulverização de glyphosate reduziu o teor foliar de N (ZABLOTOWICZ; REDDY, 2007) e os teores foliares de Ca e Mg (CAKMAK et al., 2009).

Por fim, nos experimentos em câmara de crescimento, conduzidos em sistema hidropônico, a redução dos teores de Ca e Mg foi notada após a aplicação de glyphosate para os clones GG100 e I144. Os macronutrientes catiônicos, como K, Ca e Mg podem formar complexos com o glyphosate, reduzindo, assim, a absorção e a translocação destes nutrientes (BARJA et al., 2001; UNDABEYTIA et al., 2002; CAVALIERI et al., 2012). Em girassol, micronutrientes catiônicos, como o Ca, ligaram-se ao glyphosate por meio de seus grupos carboxil e fosfanato, formando complexos estáveis com o glyphosate (BERNARDS et al., 2005). Essas interações explicam a redução constatada nessa pesquisa nos teores de cálcio e magnésio.

Crescimento

A avaliação das características de crescimento indicou menor crescimento em altura, diâmetro e número de folhas antes da pulverização de glyphosate (0 DAA) para as plantas do clone GG100 cultivadas com a menor concentração de fósforo (0,5X). O fósforo, junto a outros nutrientes, é essencial para o crescimento das plantas, uma vez que é um elemento chave envolvido em uma série de funções celulares e metabólicas essenciais para o crescimento das plantas (CROUS et al., 2015).

Quando o fósforo está disponível em quantidades adequadas e em uma forma biológica facilmente absorvida, o resultado geralmente é o incremento das taxas de crescimento das plantas (VITOUSEK et al., 2010). Nessa pesquisa, o maior crescimento em altura, diâmetro e número de folhas foi constatado para as plantas cultivadas com 1X e 1,5X. Para os clones GG100 e I144, as maiores massas secas de folhas e caules também foram mensurados nas plantas cultivadas com 1,5X de fósforo.

Já as maiores massas secas de raízes foram quantificadas nas plantas de ambos os clones cultivadas com 0,5X de fósforo. Possivelmente, as plantas desenvolveram mecanismos de adaptação que possibilitam incrementar a aquisição de nutrientes. Dentre as adaptações realizadas, podem ser citadas: 1- aumento da divisão celular no meristema apical, responsável pelo crescimento indeterminado da raiz pela adição de novas células; 2 - alongamento celular, principal processo responsável pelo crescimento; 3 – formação de grande número de raízes laterais, que aumentam a capacidade de exploração do solo; e 4 - formação de pelos radiculares, que incrementam a superfície de contato solo-planta (LÓPEZ-BUCIO et al., 2003).

No entanto, o clone I144 não apresentou alterações nas características de crescimento (altura, diâmetro e número de folhas) antes da pulverização de glyphosate (0 DAA). Diferenças no comportamento de clones de eucalipto quanto ao crescimento já foram muito relatadas na literatura (FURTINI NETO et al., 1996; GONÇALVES; PASSOS, 2000) e provavelmente refletem diferenças quanto a

eficiência nutricional (BARROS et al., 2004; LIMA et al., 2005; PINTO et al., 2011, entre outros).

Como já apresentado no Capítulo 2, o clone I144 tem maior capacidade de absorção, translocação e utilização de fósforo. Por meio da avaliação dessas características de crescimento foi possível perceber que o clone I144 foi mais eficiente nutricionalmente mesmo quando o P estava disponível em menor quantidade (plantas cultivadas com 0,5X). Assim, embora cultivadas com diferentes concentrações de fósforo, inicialmente todas as plantas do clone I144 apresentaram crescimento semelhante.

A pulverização das maiores doses de glyphosate reduziu a altura, o diâmetro e, principalmente, o número de folhas das plantas. Nos clones GG100 e I144, o número de folhas foi reduzido em mais de 80,0 e 70,0%, respectivamente. Reduções no crescimento de eucalipto após a deriva acidental de glyphosate são muito comuns na literatura (TUFFI SANTOS et al., 2006; PEREIRA et al., 2013; CARVALHO et al., 2013; 2014; 2015).

O glyphosate atua diretamente na rota do chiquimato, inibindo a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, como fenilalanina, tirosina e triptofano, que são precursores de produtos como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos (TAN et al., 2006; REDDY et al., 2008), que por sua vez são indispensáveis para a síntese de proteínas e para o crescimento das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013; NELSON, 2008). Dessa forma, a pulverização de glyphosate reduziu ou até mesmo paralisou o crescimento e o acúmulo de massa seca das plantas de eucalipto.

O glyphosate também apresenta uma série de efeitos indiretos, como o decréscimo da taxa fotossintética, da produção de clorofila (ZOBIOLE et al., 2010a) e imobilização de alguns nutrientes nos tecidos foliares (CAKMAK et al., 2009). Segundo Ireland et al. (1986), qualquer substância que induz alterações metabólicas, diretas ou indiretas, afetam o nível dos intermediários e/ou da atividade das enzimas do ciclo de Calvin. Uma vez que o acúmulo de massa seca depende da energia suprida pela fotossíntese para sintetizar compostos carbônicos, o comprometimento da assimilação do CO₂ irá acarretar na redução do acúmulo de massa seca (MAGALHÃES FILHO et al., 2008). Essas alterações na fotossíntese

foram evidenciadas ao longo dos resultados e da discussão dessa pesquisa, culminando no menor crescimento e acúmulo de massas secas e alguns nutrientes.

As pulverizações de subdoses de glyphosate induziram o aumento de algumas das características avaliadas. Para o clone GG100, a dose 36 g e.a. ha⁻¹ promoveu incrementos na altura e no diâmetro das plantas; e o uso de 18 g e.a. ha⁻¹ aumentou na massa seca de caule. Já para o clone I144, doses entre 7,2 e 36 g e.a. ha⁻¹ incrementaram a altura e o diâmetro das plantas.

Enquanto as altas doses de glyphosate inibem o crescimento das plantas, as aplicações de subdoses de glyphosate podem estimular o crescimento das plantas (VELINI et al., 2008). Esse fenômeno é denominado hormese, hormesis ou efeito hormético, e tem sido relatado quando diversos organismos são submetidos à exposição de baixas doses de variados compostos, e entre eles, glyphosate (DUKE et al., 2006; VELINI et al., 2010; CEDERGREEN; OLESEN, 2010; PEREIRA et al., 2013; CARVALHO et al., 2013). A hormesis já foi relatada por diversos pesquisadores e em várias espécies: café, eucalipto, milho, pinus, soja convencional, na planta daninha *Commelina benghalensis* (WAGNER et al., 2003; VELINI et al., 2008; FRANÇA et al., 2010; PEREIRA et al., 2013).

Esse fenômeno provavelmente está relacionado com o alvo molecular do glyphosate - a enzima EPSPs - uma vez que o efeito não foi observado em plantas resistentes a esse herbicida. Contudo, o mecanismo pelo qual esse fenômeno ocorre ainda não é totalmente conhecido (VELINI et al., 2008; 2010).

Para aumentar o crescimento e/ou a biomassa, as plantas devem aumentar sua taxa de fotossíntese ou reduzir sua taxa de respiração (CEDERGREEN; OLESEN, 2010). Teoricamente, reduzir a taxa de respiração é improvável, uma vez que a aplicação de herbicidas promove a ativação de processos de desintoxicação da planta e, portanto, maior gasto de energia (COLE, 1994; PURRINGTON; BERGELSON, 1999).

Dessa forma, muito pesquisadores atribuem esse incremento observado nas características supracitadas ao aumento na atividade fotossintética. Outra possibilidade seria o aumento da taxa fotossintética em resposta a um estímulo do sistema hormonal das plantas (CEDERGREEN et al., 2007). No entanto, nessa pesquisa não foi constatado aumento na taxa fotossintética das plantas que

apresentaram hormesis. Alguns pesquisadores ainda afirmam que a hormesis pode ocorrer em função de mudanças fisiológicas, como teor de proteínas, por exemplo.

O efeito hormético ainda é variável e dependente de fatores como clima, espécies/cultivares/clones, idade da planta, e a própria formulação do herbicida utilizado (BELZ; CEDERGREEN, 2010; VELINI et al., 2010). Por esses motivos, o uso de subdoses de glyphosate não é recomendado como estimulante do crescimento das culturas.

Interações entre concentrações de fósforo e doses de glyphosate

Interações entre as concentrações de fósforo e as doses de glyphosate ocorreram principalmente nas características que avaliaram o processo fotossintético (eficiência quântica do PSII e teor relativo de clorofilas), teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico, teores nutricionais e massas secas. O desdobramento dessas interações evidenciou que, de modo bem geral, o comprometimento do processo fotossintético, os maiores teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico, os menores teores nutricionais e os menores acúmulos de massa seca foram observados após a pulverização foliar e a aplicação radicular de glyphosate nas plantas cultivadas com menores concentrações de fósforo (0,5X e, em alguns casos, 1X).

Possivelmente, nas plantas cultivadas com as menores concentrações de fósforo, ocorreu o aumento da expressão dos genes transportadores de fósforo de alta afinidade. Algumas pesquisas relataram que as plantas podem reduzir a deficiência de fósforo através da coordenação da expressão dos genes envolvidos em seu transporte. Acredita-se na existência de dois sistemas de absorção de fósforo na forma inorgânica, sendo um de alta afinidade, ativado em condições de baixa disponibilidade de fósforo, e outro de baixa afinidade, expresso constitutivamente (RAGHOTHAMA, 1999). Ainda, segundo esse pesquisador, a concentração de fósforo no vacúolo e a concentração de fósforo no meio externo contribuem para ativar os mecanismos de regulação gênica dos transportadores de alta e baixa afinidade.

A indução de transportadores de fosfato de alta afinidade pela baixa disponibilidade de fósforo já foi relatada em tomateiro (LIU et al., 1998; DARAM, 1998) e em *Arabidopsis thaliana* (GUO et al., 2008; BAYLE et al., 2011).

Assim, a hipótese para justificar a interação fósforo x glyphosate constatadas nessa pesquisa consiste na alteração da expressão gênica dos transportadores de fósforos nas plantas cultivadas em baixas concentrações de fósforo, na tentativa de absorver e/ou translocar mais fósforo e realizar suas funções normalmente. Dessa forma, essas plantas “iniciaram” ou “incrementaram” a síntese de transportadores de fósforo de alta afinidade.

Enquanto os transportadores de alta afinidade são muito específicos (se ligam apenas a formas específicas de fósforo), os transportadores de baixa afinidade não apresentam essa especificidade e, portanto, se ligam com uma série de compostos que tenham fósforo em sua composição.

O glyphosate apresenta em sua molécula um grupo fosfato. Dessa forma, é passível de ser reconhecido como fonte de fósforo e ser transportado por transportadores de baixa afinidade.

A competição do glyphosate com o fosfato pelo mesmo sítio de adsorção já foi relatada na literatura (BRECKE; DUKE, 1980; FITZGIBBON; BRAYMER, 1988; DENIS; DELROT, 1993; PIPKE, 1987; MORIN et al., 1997; GODOY, 2007). No entanto, essa relação nunca foi estabelecida em espécies perenes, como o eucalipto.

Em suma:

1. As características fotossintéticas eficiência quântica do PSII e teores de clorofilas foram reduzidas de modo mais intenso nas plantas cultivadas com menores concentrações de fósforo antes ou após a aplicação de glyphosate. Após glyphosate, as maiores reduções nos teores de clorofila e na eficiência quântica do PSII ocorreram nas plantas cultivadas com 0,5X ou 1X de fósforo.

2. A fotossíntese e a condutância estomática foram reduzidas a partir das 96 e 120 HAA de glyphosate, respectivamente.

3. A pulverização de glyphosate aumentou os teores de MDA e, portanto, a peroxidação lipídica. No entanto, não foi constatado efeito isolado do fósforo ou interação entre fósforo e glyphosate.

4. Para o clone GG100, os maiores teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico foram quantificados após a pulverização de glyphosate nas plantas cultivadas com 0,5X de fósforo. Para o clone I144, essa relação só ocorreu para o teor de AMPA. O acúmulo desses compostos aumentou com a dose de glyphosate pulverizada.

5. Em geral, plantas nutridas com 1X e/ou 1,5X apresentaram os maiores teores de N, P, K, Ca, Mg e B. O glyphosate acarretou na redução dos teores de alguns nutrientes foliares e radiculares, mas de forma bastante variável entre os experimentos (casa de vegetação e câmara de crescimento) entre os clones. O menor teor de N foi constatado para a menor concentração de fósforo (0,5X) e a dose de glyphosate 180 g e.a. ha⁻¹, para o clone GG100 em casa de vegetação. Nessa mesma condição, a interação entre fósforo e glyphosate não foi significativa sobre os teores nutricionais do clone I144. Nos experimentos em sistema hidropônico, a combinação da concentração 1,5X de fósforo com a aplicação das doses 2,5 e 10% de glyphosate reduziu os teores foliares de Ca e Mg para o clone GG100. Ainda para esse clone, os menores teores radiculares de Mg foram mensurados para 0,5X de fósforo x maiores doses de glyphosate. Para o clone I144 apenas o teor radicular de N foi reduzido nas plantas cultivadas com 0,5X de P após a aplicação de 0,144 e 0,576 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate.

6. As características de crescimento foram reduzidas em função das menores concentrações de fósforo apenas para o clone GG100. No entanto, para os clones GG100 e I144 as plantas cultivadas com 0,5X de fósforo apresentaram incremento na massa seca de raízes. Hormesis foi constatada para algumas características de crescimento após a aplicação de doses de glyphosate entre 7,2 e 36 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate para ambos os clones.

7. Interações entre as concentrações de fósforo e as doses de glyphosate ocorreram principalmente nas características que avaliaram o processo fotossintético (rendimento quântico máximo do PSII e teor relativo de clorofilas), teores de glyphosate, AMPA e ácido chiquímico, teores nutricionais e massas secas. No geral, esses teores foram menores ou mais intensamente reduzidos nas plantas cultivadas com menores concentrações de fósforo (0,5X e, em alguns casos, 1X).

CONCLUSÕES

O fósforo está correlacionado à absorção, translocação e efeitos do glyphosate nas plantas de eucalipto, uma vez que as características fotossintéticas e de crescimento, e os teores de glyphosate, AMPA, ácido chiquímico e nutricionais foram alterados pelo herbicida glyphosate, e seus efeitos ocorreram em função das concentrações de fósforo utilizadas no cultivo das plantas.

REFERÊNCIAS

- ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A. Phosphate sensing in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 1–8, 2002.
- AHSAN, N.; LEE, D. G.; LEE, K. W.; ALAM, I.; LEE, S. H.; BAHK, J. D.; LEE, B. H. Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 1062-1070, 2008.
- ALCARDE, J. C.; BORELLA, J. E. Determinação do potássio em fertilizantes por fotometria de chama de emissão. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 33, p. 751-762, 1976.
- AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRÜCKEN, H. C. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate: II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. **Plant Physiology**, v. 66, n. 5, p. 830-834, 1980.
- ARALDI, R.; VELINI, E. D.; GIROTTO, M.; CARBONARI, C. A.; JASPER, S. P.; TRINDADE, M. L. B. Efeitos na taxa de transporte de elétrons de plantas daninhas após aplicação de amicarbazone. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 647-653, 2011.

BARJA, B. C.; HERSZAGE, J.; SANTOS, A. M. Iron(III)–phosphonate complexes. **Polyhedron**, v. 20, n. 15, p. 1821-1830, 2001.

BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L.; NOVAIS, R. F. Mineral fertilizer recommendations for eucalypt plantations. In: GONÇALVES, J. L. M. **Forest nutrition and fertilization**. Piracicaba: IPEF, 2004. p. 269-284.

BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F. Eucalypt nutrition and fertilizer regimes in Brazil. In: ATTIWILL, P. M.; ADAMS, M. A. (Eds.). **Nutrition of *Eucalyptus***. Collingwood: CSIRO, 1996. p.335-355.

BAYLE, V.; ARRIGHI, J.; CREFF, A.; NESPOULOUS, C.; VIALARET, J.; ROSSIGNOL, M.; GONZALEZ, E.; PAZ-ARES, J.; NUSSAUMEA, L. *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. **The Plant Cell**, v. 23, p. 1523–1535, 2011.

BELZ, R. G.; CEDERGREEN, N. Parthenin hormesis in plants depends on growth conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 69, n. 3, p. 293-301, 2010.

BERNARDS, M. L.; THELEN, K. D.; PENNER, D.; MUTHUKUMARAN, R. B.; MCCRACKEN, J. L. Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on glyphosate absorption and translocation. **Weed Science**, v. 53, n. 6, p.787-794, 2005.

BRECKE, B. J.; DUKE, W. B. Effect of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. **Plant Physiology**, v. 66, p. 656-659, 1980.

CAKMAK, I.; YAZICI, A.; TUTUS, Y.; OZTURK, L. Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. **European Journal of Agronomy**, v. 31, p. 114-119, 2009.

CARVALHO, L. B.; ALVES, P. L. C. A.; COSTA, F. R. Differential response of clones of eucalypt to glyphosate. **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 177-187, 2015.

CARVALHO, L. B.; ALVES, P. L. C. A.; DUKE, S. O. Hormesis with glyphosate depends on coffee growth stage. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, p. 813-821, 2013.

CARVALHO, G. P.; SILVA, A. A.; NUNES, T. V.; BARBOSA, F. A.; SILVA, J. I. C.; CERQUEIRA, F. B.; ERASMO, E. A. L.; SARMENTO, R. A. Deriva simulada de triclopyr e fluroxypyr + triclopyr no desenvolvimento de mudas de clones de eucalyptus. **Revista Árvore**, v. 38, n. 1, p. 165-173, 2014.

CATUNDA, M. G.; FREITAS, S. P.; OLIVEIRA, J. G.; SILVA, C. M. M. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 115-121, 2005.

CAVALIERI, S. D.; VELINI, E. D.; SILVA, F. M. L.; SÃO JOSÉ, A. R.; ANDRADE, G. J. M. Acúmulo de nutrientes e matéria seca na parte aérea de dois cultivares de soja RR sob efeito de formulações de glyphosate. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 349-358, 2012.

CEDERGREEN, N.; OLESEN, C. F. Can glyphosate stimulate photosynthesis? **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 96, p. 140-148, 2010.

CEDERGREEN, N.; STREIBIG, J. C.; KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K.; DUKE, S. O. The occurrence of hormesis in plants and algae. **Dose-Response**, v. 5, p. 150-162, 2007.

COLE, D. J. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. **Pest Science**, v. 42, n. 3, p. 209-222, 1994.

COLE, D.J. Mode of action of glyphosate-a literature analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. Capítulo 5, p. 48- 74.

CORBETT, J. R. **The biochemical mode of action of pesticides**. 2 ed. London: Academic Press, 1984. 382 p.

CORRÊA, M. J. P.; ALVES, P. L. C. A. Efeitos da aplicação de herbicidas sobre a eficiência fotoquímica em plantas de soja convencional e geneticamente modificada **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1136-1145, 2010.

CROUS, K. Y.; OSVALDSSON, A.; ELLSWORTH, D. S. Is phosphorus limiting in a mature *Eucalyptus* woodland? Phosphorus fertilization stimulates stem growth. **Plant Soil**, v. 391, p. 293–305, 2015.

CRUZ, M. C. M.; SIQUEIRA, D. L.; SALOMÃO, L. C.C.; CECON, P. R. Fluorescência da clorofila a em folhas de tangerineira 'Ponkan' e limeira-ácida 'Tahiti' submetidas ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 896-901, 2009.

DARAM, P.; BRUNNER, S.; PERSON, B. L.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. **Planta**, v. 206, p. 225-233, 1998.

DENIS, M. H.; DELROT, S. Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. **Physiologia Plantarum**, v. 87, p. 569–575, 1993.

DUKE, S. O.; CEDERGREEN, N.; VELINI, E. D.; BELZ, R. G. Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? **Outlooks on Pest Management**, v. 17, n. 1, p. 29-33, 2006.

FRANÇA, A. C.; FREITAS, M. A. M.; FIALHO, C. M. T.; SILVA, A. A.; REIS, M. R.; GALON, L.; VICTORIA FILHO, R. Crescimento de cultivares de café arábica submetidos a doses do glyphosate. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 599-607, 2010.

FEDTKE, C. **Biochemistry and physiology of herbicide action**. Berlin: Springer-Verlag. 1982. 202 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores do fotossistema 2. In: VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. (Eds.). **Herbicidologia**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p. 100-112.

FLÜGGE, U. I.; HÄUSLER, R. E.; LUDEWIG, F.; FISCHER, K. Functional genomics of phosphate antiport systems of plastids. **Physiologia Plantarum**, v. 118, p. 475-482, 2003.

FUCHS, M. A.; GEIGER, D. R.; REYNOLDS, T. L.; BOURQUE, J. E. Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* medikus). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 74, n. 1, p. 27-39, 2002.

FURTINI NETO, A. E.; BARROS, N. F.; GODOY, M. F.; NOVAIS, R. F. Eficiência nutricional de mudas de *Eucalyptus* em relação a fósforo. **Revista Árvore**, n. 20, p. 17-28, 1996.

GODOY, M. C. **Efeitos do glyphosate sobre o crescimento e absorção do fósforo pela soja**. 2007. 43 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

GONÇALVES, M. R.; PASSOS, C. A. M. Crescimento de cinco espécies de eucalipto submetidas a déficit hídrico em dois níveis de fósforo. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 145-161, 2000.

GUO, B.; JIN, Y.; WUSSLER, C.; BLANCAFLOR, E. B.; MOTES, C. M.; VERSAW, W. K. Functional analysis of the *Arabidopsis* PHT4 family of intracellular phosphate transporters. **New Phytologist**, v. 177, p. 889–898, 2008.

HENDRICKSON, L.; CHOW, W. S.; FURBANK, R. T. Low temperature effects on grapevine photosynthesis: the role of inorganic phosphate. **Functional Plant Biology**, v. 31, p. 789-801, 2004.

HESS, F. D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, v. 48, n. 2, p. 160-170, 2000.

HIRSCH, J.; MARIN, E.; FLORIANI, M.; CHIARENZA, S.; RICHAUD, P.; NUSSAUME, L.; AND THIBAUD, M.C. Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in *Arabidopsis* plants. **Biochimie**, v. 88, p. 1767–1771, 2006.

HORTON, P.; RUBAN, A. V.; WALTERS, R. G. Regulation of light harvesting in green plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 655-684, 1996.

IBA. 2015. Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Iba 2015**. Disponível em: <iba.org/images/shared/iba_2015.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2016.

IRELAND, C. R.; PERCIVALI, M. P.; BAKER, N. R. Modification of the induction of photosynthesis in wheat by glyphosate, an inhibitor of amino acid metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 37, n. 176, p. 299-308, 1986.

FITZGIBBON, J.; BRAYMER, H. D. Phosphate Starvation Induces Uptake of Glyphosate by *Pseudomonas* sp. Strain PG2982. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1886-1888, 1988.

KOGER, C. H.; SHANER, D. L.; KRUTTZ, T. W.; BUEHRING, N.; HENRY, W. B.; THOMAS, W. E.; WILKUT, J. W. Rice (*Oryza sativa*) response to drift rates of glyphosate. **Pest Management Science**, v. 61, n. 12, p. 1161-1167, 2005.

KRAUSE, G.H.; WEISS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349, 1991.

KRAUSE, G. H.; WINTER, K. Photoinhibition of photosynthesis in plants growing in natural tropical forest gaps: a chlorophyll fluorescence study. **Botanica Acta**, v. 109, n. 6, p. 456-462, 1996.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 275-294, 2002.

LEDFORD, H. K.; NIYOGI, K. K. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. **Plant Cell and Environment**, v. 28, n. 8, p. 1037-1045, 2005.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSHMANN, C.; KNAPP, M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RfD of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica**, v. 43, n. 03, p. 379-393, 2005.

LIMA, A. M. N.; NEVES, J. C. L.; SILVA, I. R. LEITE, F. P. Cinética de absorção e eficiência nutricional de K, Ca e Mg em plantas jovens de quatro clones de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 6, p. 903-909, 2005.

LIU, C.; TRIEU, A. T.; BLAYLOCK, L. A.; HARRISON, M. J. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. **Molecular Plant**, v. 11, p. 14-22, 1998.

LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMIREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutriente availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 280- 287, 2003.

LYDON, J.; DUKE, S. O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 813-818, 1988.

MACHADO, A. F. L.; FERREIRA, L. R.; SANTOS, L. D. T.; FERREIRA, F. A.; VIANA, R. G.; MACHADO, M. S.; FREITAS, F. C. L. Eficiência fotossintética e uso da água em plantas de eucalipto pulverizadas com glyphosate. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 319-327, 2010.

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

MAGALHÃES, P. C.; SILVA, J. B.; DURÃES, F. O. M.; KARAM, D.; RIBEIRO, L. S. Efeito de doses reduzidas de glyphosate e paraquat simulando deriva na cultura do sorgo. **Planta Daninha**, v. 19, n. 2, p. 255-262, 2001.

MAGALHÃES FILHO, J. R.; AMARAL, L. R.; MACHADO, D. F. S. P.; MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira 'Valência' sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, v. 67, p. 693-699, 2008.

MARÍA, N.; FELIPE, M.R.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. Alterations induced by glyphosate on lupin photosynthetic apparatus and nodule ultrastructure and some oxygen diffusion related proteins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 10-11, p. 985-996, 2005.

MATALLO, M. B.; ALMEIDA, S. D. B.; CERDEIRA, A. L.; FRANCO, D. A.; BLANCO, F. M. G.; MENEZES, P. T. C.; LUCHINI, L. C.; MOURA, M. A. M.; DUKE, S. O. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. **Planta Daninha**, v. 27, p. 987-994, 2009.

MAXWEEL, K.; JOHNSON, G. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000.

MAZZA, C. A.; BOCCALANDRO, H. E.; GIORDANO C. V.; BATTISTA, D.; SCOPEL, A. L.; BALLARÉ, C. L. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. **Plant Physiology**, v. 122, n. 1, p. 117-126, 2000.

MESCHEDE, D.; CARBONARI, C.; VELINI, E. D. Efeito de subdoses de glyphosate sobre o crescimento e desenvolvimento de *Commelina bengalensis*. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE GLYPHOSATE, 2007. **Anais...** Botucatu: FEPA, 2007. p. 65-67.

MESSINGER, S.M.; BUCKLEY, T. N.; MOTT, K. A. Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO₂. **Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 771-778, 2006.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MOLDES, C. A. **Resposta de enzimas antioxidantes à aplicação do herbicida glifosato em variedades de soja transgênica e não transgênica**. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

MORIN F.; VERA, V.; NURIT F.; TISSUT, M.; MARIGO, G. Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: Role of a phosphate transporter. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 58, p.13-22, 1997.

MUELLER, T. C.; MASSEY, J. H.; HAYES, R. M.; MAIN, C. L.; STEWART, C. N. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 680-84, 2003.

NAIFF, A. P. M. **Crescimento, composição mineral e sintomas visuais de deficiências de macronutrientes em plantas de *Alpinia purpurata* cv. jungle king**. 2007. 77 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2007.

NAVES-BARBIERO, C. C.; FRANCO, A. C.; BUCCI, S. J.; GOLDSTEIN, G. Fluxo de seiva e condutância estomática de duas espécies lenhosas sempre-verdes no campo sujo e cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n. 12, v. 2, p. 119-134, 2000.

NELSON, S.C. **Glyphosate injury to coffee plants**. Honolulu: University of Hawaii, 2008. 5p.

NEUMANN, G.; KOHLS, S.; LANDSBERG, E.; STOCK-OLIVEIRA SOUZA, K.; YAMADA, T.; ROMHELD, V. Relevance of glyphosate transfer to non-target via the rhizosphere. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 20, p. 963-969, 2006.

OLIVEIRA, J. G.; ALVES, P. L. C. A.; MAGALHÃES, A. C. The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 95-104, 2002.

PEREIRA, F. C. M.; NEPOMUCENO, M. P.; PIRES, R. N.; PARREIRA, M. C.; ALVES, P. L. C. A. Response of eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) plants at different doses of glyphosate. **Journal of Agricultural Science**; v. 5, n. 1; p. 66-74, 2013.

PINTO, S. I. C.; FURTINI NETO, A. E.; NEVES, J. C. L.; FAQUIN, V.; MORETTI, B. S. Eficiência nutricional de clones de eucalipto na fase de mudas cultivados em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 2, p. 523-533, 2011.

PIPKE, R.; SCHULZ, A.; AMRHEIN, N. Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 974-978, 1987.

PLINE, W. A.; WILCUT, J. W.; DUKE, S. O.; EDMISTEN, K. L.; WELLS, R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 506-512, 2002.

PLINE-SRNIC, W. Physiological Mechanisms of Glyphosate Resistance. **Weed Technology**, v. 20, n. 2, p. 290-300, 2006.

PRESTON, C.; WAKELIN, A. M. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. **Pest Management Science**, n. 64, v. 4, p. 372-376, 2008.

PURRINGTON, C. B.; BERGELSON, J. Exploring the physiological basis of costs of herbicide resistance in *Arabidopsis thaliana*. **The American Naturalist**, v. 154, n. 1, p. 82-91, 1999.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 665-686, 1999.

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**, v. 52, p. 5139-5143, 2004.

REDDY, K.N.; RIMANDO, A. M.; NANDULA, V.K. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2125-2130, 2008.

SANTOS, M. G; RIBEIRO, V. R.; TEIXEIRA, M. G.; OLIVEIRA, R. F.; PIMENTEL, C. Foliar phosphorus supply and CO₂ assimilation in common bean under water deficit. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 3, p. 407-411, 2006.

SANTOS, F. M.; VARGAS, L.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; MATALLO, M. B.; MARIANI, F.; CHAVARRIA, G.; AGOSTINETTO, D. Effect of glyphosate on the physiological parameters of horseweed. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 4, p. 519-525, 2014.

SERRA, A. P.; MARCHETTI, M. E.; CANDIDO, A. C. S.; DIAS, A. C. R.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Influência do glifosato na eficiência nutricional do nitrogênio, manganês, ferro, cobre e zinco em soja resistente ao glifosato. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 77-84, 2011.

SHUBHRA; DAYAL, J.; GOSWAMI, C. L.; MUNJAL, R. Influence of phosphorus application on water relations, biochemical parameters and gum content in cluster bean under water deficit. **Biologia Plantarum**, v. 48, p. 445-448, 2004.

SILVA, A. F.; CONCENÇO, G.; ASPIAZÚ, I.; FERREIRA, E. A.; GALON, L.; COELHO, A. T. C. P.; SILVA, A. A.; FERREIRA, F. A. Interferência de plantas daninhas em diferentes densidades no crescimento da soja. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 75-84, 2009.

SILVA, L.; MARCHIORI, P. E. R.; MACIEL, C. P.; MACHADO, E. C.; RIBEIRO, R. V. Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 9, p. 965-972, 2010.

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**, v. 11, n. 1, p. 13-20, 1999.

TAN, S. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. **Amino Acids**, v. 30, n. 2, p. 195-204, 2006.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 321-346, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TEDESCO, J. M.; GIANELLO, C.; BISSANI, A. C.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de Solo, Plantas e Outros Materiais**, 2^a ed., Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p.

TUFFI SANTOS, L.D.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R.; DUARTE, W.M.; TIBURCIO, R.A.S.; SANTOS, M.V.V. Intoxicação de espécies de eucalipto submetidas à deriva do glyphosate. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 359-364, 2006.

VELINI, E. D.; ALVES, E.; GODOY, M. C.; MESCHEDE, D. K.; SOUZA, R. T.; DUKE, S. O. Glyphosate at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, v. 64, p. 489-496, 2008.

VELINI, E. D.; TRINDADE, M. L. B.; BARBERIS, L. R. M.; DUKE, S. O. Growth regulation and other secondary effects of herbicides. **Weed Science**, v. 58, p. 351-354, 2010.

VERSAW, W. K.; HARRISON, M. J. A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate starvation responses. **Plant Cell**, v. 14, p. 1751-1766, 2002.

UNDABEYTIA, T.; MORILLO, E.; MAQUEDA, C. FTIR study of glyphosate-copper complexes. **Journal of Agricultura Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1918-1921, 2002.

VITOUSEK, P. M.; PORDER, S.; HOULTON, B. Z.; CHADWICK, O. A. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. **Ecological Applications**, v. 20, p. 5–15, 2010.

WAGNER R; KOGAN, M.; PARADA, A. M. Phytotoxic activity of root absorbed glyphosate in corn seedlings (*Zea mays* L.). **Weed Biology and Management**, v. 3, n. 4, p. 228-232, 2003.

XU, H.; VAVILIN, D.; VERMAAS, K. N. Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 14168–14173, 2001.

YOUNG, A. L.; FRANK, H. A. Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 1996.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. **Crop Protection**, v. 26, n. 3, p. 370-376, 2007.

ZOBIOLE, L. H. S.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; HUBER, D. M.; CONSTANTION, J.; CASTRO, C.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA JUNIOR, A. Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. **Plant Soil**, v. 328, n. 1, p. 57-69, 2009.

ZOBIOLE, L. H. S.; KREMER, R. J.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J. Glyphosate affects photosynthesis in first and second generation of glyphosate-resistant soybeans. **Plant Soil**, v. 336, n. 1-2, p. 251-265, 2010a.

ZOBIOLE, L. H. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; KREMER, R. J.; CONSTANTIN, J.; BONATO, C. M.; MUNIZ, A. S. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 182-193, 2010b.

ZOBIOLE, L. H. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; KREMER, R. J.; MUNIZ, A. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. Nutrient accumulation and photosynthesis in glyphosate-resistant soybeans is reduced under glyphosate use. **Journal of Plant Nutrition**, v. 33, n. 12, p. 1860-1873, 2010c.

ZOBIOLE, L. H. S.; KREMER, R. J.; OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTANTIN, J. Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 53-60, 2011.

CAPÍTULO 4 – Expressão gênica de transportadores de fosfato e efeitos do fosfato na absorção, translocação e transporte de ¹⁴C-glyphosate em eucalipto

RESUMO – A baixa disponibilidade de fosfato solúvel é o principal fator limitante ao crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas. Diante dessa situação, as plantas desenvolveram algumas adaptações que visam aumentar a aquisição deste nutriente, como, por exemplo, a coordenação de transportadores de fosfato. O glyphosate é um herbicida muito utilizado em todo o mundo, e pesquisas indicaram a possibilidade de que o glyphosate possa ser transportado através da membrana plasmática por meio de transportadores de fosfato. Para investigar essa hipótese em eucalipto, experimentos foram conduzidos em *Eucalyptus grandis* para avaliar a coordenação da expressão gênica, a absorção e a translocação de ¹⁴C-glyphosate aplicado via foliar ou radicular, e a absorção de glyphosate através da membrana plasmática em protoplastos, sempre na presença e ausência de fosfato. As plantas de *Eucalyptus grandis* alteraram a expressão gênica dos transportadores de fosfato nas folhas e nas raízes em resposta a deficiência de fosfato. De modo geral, a expressão de transportadores de alta afinidade foi incrementada pela deficiência de fosfato, principalmente nas raízes. A absorção de ¹⁴C-glyphosate aplicado via foliar ou radicular foi maior nas plantas submetidas à deficiência de fosfato. A translocação de ¹⁴C-glyphosate também foi mais rápida nessas plantas. Nos protoplastos, a absorção de ¹⁴C-glyphosate via membrana plasmática ocorreu de modo mais lento quando NaH₂PO₄ foi adicionado à suspensão de protoplastos. Possivelmente, o transporte de fosfato através da membrana plasmática foi realizado em um primeiro momento. Contudo, com a redução do conteúdo de fosfato extracelular, o glyphosate foi absorvido pelos protoplastos.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*, membrana plasmática, proteínas, transportadores de fosfato.

Abstract – Soluble phosphate low availability is the main limiting factor for plant growth, development and yield. Given this situation, plants developed some adaptations to increase the phosphate acquisition, such as, for example, the coordination of phosphate transporters. Glyphosate is an herbicide widely used throughout the world, and researches indicated the possibility that glyphosate can be transported across the plasma membrane via phosphate transporters. To investigate this hypothesis in eucalypt, experiments were conducted in *Eucalyptus grandis* to evaluate the gene expression coordination, the absorption and translocation of ^{14}C -glyphosate applied in leaves or roots, and ^{14}C -glyphosate absorption across the plasma membrane in protoplasts, always in the presence and absence of phosphate. *Eucalyptus grandis* plants modified the phosphate transporters gene expression in leaves and roots as a phosphate deficiency response. In general, the expression of high affinity transporters was increased by phosphate deficiency, particularly in roots. ^{14}C -glyphosate absorption applied in leaves or roots was higher in plants submitted to phosphate deficiency. Translocation of ^{14}C -glyphosate was also faster in those plants. In protoplasts, ^{14}C -glyphosate absorption through plasma membrane occurred slowly when NaH_2PO_4 was added to the protoplast suspension. Possibly the phosphate transport across the plasma membrane was carried out on a first moment. However, by reducing the extracellular phosphate content, glyphosate is absorbed by the protoplasts.

Keywords: cell membrane, *Eucalyptus grandis*, gene expression, proteins, phosphate transporters.

INTRODUÇÃO

O crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas agrícolas são dependentes da disponibilidade de fósforo, nutriente essencial para as plantas. No entanto, muitas áreas apresentam deficiência de fósforo ou mesmo concentrações ideais deste nutriente no solo, mas em uma forma indisponível para as plantas (BAYLE et al., 2011).

Para lidar com a limitação de fósforo, as plantas desenvolveram uma série de mecanismos, como alterações radiculares para incrementar a aquisição de fosfato inorgânico do solo, e outros para otimizar sua armazenagem, remobilização e todo processo metabólico que demanda fósforo (POIRIER, BUCHER, 2002). As plantas ainda podem “reprogramar” seu metabolismo e a coordenação gênica de proteínas, fato atualmente evidenciado por estudos da expressão de genes utilizando microarrays de DNA (HAMMOND et al., 2003; WU et al., 2003; CALDERON-VAZQUEZ et al., 2008), proteômica (LI et al., 2007; 2008) e metabolômica (MORCUENDE et al., 2007).

Após a absorção do fosfato inorgânico pelas raízes, esse nutriente é transportado através da membrana plasmática das células epidérmicas e corticais por meio de um conjunto de transportadores de fosfato (POIRIER; BUCHER, 2002). Atualmente, já foram identificados genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de fosfato em plantas superiores. Esses transportadores são responsáveis pela aquisição de fosfato através da membrana plasmática, pelo transporte de fosfato para cloroplastos, mitocôndrias, complexo de Golgi e pela redistribuição de fosfato por toda a planta (MUDGE et al., 2002; POIRIER; BUCHER, 2002; VERSAW; HARRISON, 2002; RAGHOTHAMA; KARTHIKEYAN, 2005; GUO et al., 2008; CUBERO et al., 2009).

Em condições de deficiência de fosfato, algumas espécies alteraram sua expressão gênica, o que acarretou no aumento da expressão de transportadores de fosfato de alta afinidade, capazes de aumentar o influxo de fosfato várias vezes (LEE, 1993). Em *Arabidopsis thaliana*, a indução de transportadores de fosfato de alta afinidade ocorreu nas primeiras 12 horas de privação de fosfato (MISSION et al., 2005).

Em eucalipto, uma cultura intensamente cultivada em solos muitas vezes deficientes em fosfato, ainda são muito escassas pesquisas que estudem a coordenação da expressão gênica de transportadores de fosfato em situação de deficiência desse nutriente, destacando que a interferência imposta pelas plantas daninhas em eucaliptais acirra o processo competitivo por nutrientes e outros fatores limitados no meio. Nesse mesmo contexto, o controle das plantas infestantes, na maioria das áreas, é essencial para a obtenção de elevadas produtividades. Para

isto, o controle químico é o método mais utilizado, e o glyphosate é o herbicida mais empregado para o controle de plantas daninhas em diversos momentos ao longo do ciclo da cultura do eucalipto.

Após ser pulverizado sobre as folhas, o glyphosate é absorvido e transportado rapidamente para os meristemas e os tecidos jovens em crescimento, tanto da parte aérea como da raiz. Após ser absorvido, o glyphosate é translocado via floema, o que exige que esse composto atravesse a membrana das células do parênquima ou do floema (GOUGLER; GEIGER, 1981; MARTIN; EDGINGTON, 1981; DEWEY; APPLEBY, 1983).

Em experimentos com discos foliares de *Beta vulgaris* (GOUGLER; GEIGER, 1981) e *Vicia faba* (IBAOUI et al., 1986) concluiu-se que o glyphosate entrou no simplasto por difusão passiva não facilitada. No entanto, esses estudos utilizaram algum tipo adjuvante, o que pode ter potencializado a absorção de glyphosate, por exemplo, alterando a permeabilidade da membrana celular (WYRILL; BURNSIDE, 1976; RICHARD; SLIFE, 1979; SHERRICK et al., 1986; RUITER et al., 1988).

Contudo, outros pesquisadores afirmam que a membrana celular poderia ser relativamente impermeável ao glyphosate, uma vez que esse composto é um íon dipolar e hidrofílico, e dificilmente será transportado por difusão passiva (RUITER; MEINEN, 1996). Dessa forma, transportadores transmembranares seriam essenciais para realizar o transporte de glyphosate via membrana plasmática.

Em experimentos com protoplastos de *Vicia faba* demonstrou-se que, além da difusão, um transportador de fosfato provavelmente está envolvido no transporte de glyphosate via membrana plasmática (DENIS; DELROT, 1993). Em *Arthrobacter* (uma bactéria capaz de metabolizar glyphosate) o transporte desse herbicida foi mediado por um transportador de fosfato, e a concentração de fosfato do meio controlou a atividade do sistema de absorção de glyphosate. O fosfato ainda atuou como um potente inibidor competitivo da absorção de glyphosate nesta mesma bactéria (PIPKE et al., 1987; PIPKE; AMRHEIN, 1988).

Assim, aventa-se a hipótese de que, em plantas de eucalipto a expressão dos transportadores de fosfato pode ser alterada em função da deficiência de fosfato, e que assim como ocorrem em outras espécies de plantas e bactérias, transportadores

de fosfato podem transportar glyphosate, e esse transporte pode ser inibido por pela presença de fosfato.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar, em *Eucalyptus grandis*, a coordenação da expressão gênica de transportadores de fosfato, a absorção e a translocação de ^{14}C -glyphosate aplicado via foliar e radicular, e a absorção de ^{14}C -glyphosate através da membrana plasmática em protoplastos, sempre na presença e ausência de fosfato.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento I – expressão gênica de transportadores de fosfato

Uma vez que pesquisas com transportadores de fosfato em eucalipto são escassas, foi necessário comparar os possíveis transportadores de fosfato encontrados no genoma de *Eucalyptus grandis* com os transportadores de fosfato já identificados em *Arabidopsis thaliana*.

Para isto, uma busca por possíveis transportadores de fosfato foi conduzida em todo o genoma de *Eucalyptus grandis* utilizando o software Phytozome System for Comparative Plant Genomics v7.0. A partir dos resultados dessa busca, foram obtidas 29 sequências de aminoácidos denominadas “possíveis transportadores de fosfato” em eucalipto.

As sequências de aminoácidos dos transportadores de fosfato de *Arabidopsis thaliana* foram obtidas no website The Arabidopsis Information Resource (TAIR, 2015). Uma vez que pesquisas com esses transportadores estão disponíveis na literatura, foram escolhidos transportadores de fosfato pertencentes a quatro categorias de transportadores: alta afinidade, baixa afinidade, transportadores de fosfato presentes nas raízes e transportadores de fosfato das raízes para o xilema.

Foi realizado o alinhamento entre as sequências de aminoácidos dos transportadores de *E. grandis* e *A. thaliana* utilizando-se o software ClustalW 2.0 (LARKIN et al., 2007). O arquivo resultante desse alinhamento foi utilizado para gerar uma árvore filogenética com o software MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013).

Utilizou-se o método algorítmico de agrupamento neighbor-joining e, como teste de confiança, utilizou-se a metodologia de bootstrap para 2500 réplicas.

A partir da árvore filogenética, foram selecionadas 11 possíveis transportadores de fosfato em *E. grandis*, de acordo com sua similaridade com os transportadores de *A. thaliana*. Assim, foram desenhados 11 pares de primers (forward e reverse) para RT qPCR, que foram previamente testados em PCR.

Sementes de *E. grandis* foram germinadas em bandejas preenchidas com uma mistura de perlita e areia (3:1 v/v), cobertas por uma fina camada de areia. Após a germinação, as mudas que apresentaram as duas folhas cotiledonares e o primeiro par de folhas verdadeiras foram transplantadas para vasos plásticos preenchidos com uma mistura de substrato para plantio e vermiculita (1:3 v/v).

Essas plantas foram mantidas em uma câmara de crescimento com temperatura média de 26 °C, umidade em torno de 60%, fotoperíodo de 16 horas e luz artificial com intensidade de 240 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$. As mudas foram irrigadas a cada dois dias e fertilizadas três vezes por semana com solução nutritiva completa (HOAGLAND; ARNON, 1950).

Para a extração de RNA, plantas com cerca de três meses, com altura (10-15 cm) e desenvolvimento semelhante foram selecionadas. Suas raízes foram cuidadosamente lavadas com água destilada para remoção do substrato remanescente. Essas plantas foram transferidas para um sistema hidropônico com solução nutritiva completa (HOAGLAND; ARNON, 1950). Nos primeiros 7 dias, foi utilizada solução nutritiva com 50% da força iônica para aclimação ao sistema. Após esse período, as plantas permaneceram por mais 7 dias em solução nutritiva com 100% da força iônica.

Após esses 14 dias, as plantas foram submetidas aos tratamentos P+ (solução nutritiva completa) e P- (solução nutritiva ajustada, onde o KH_2PO_4 foi substituído por K_2SO_4 como proposto por Jain et al. (2007)) por 5 dias. Durante todo o período o pH da solução foi ajustado para $6,0 \pm 0,3$.

Para a extração do RNA total, folhas e raízes das plantas de eucalipto submetidas aos tratamentos P+ e P- foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Para cada um dos tratamentos foram amostradas três plantas e, em cada uma dessas plantas, foram coletadas 3 repetições biológicas.

O RNA total foi extraído com a utilização do kit mirVana™ (Life Technologies®). O RNA obtido foi utilizado como modelo para a transcrição reversa utilizando o SuperScript III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen®). Com estes kits foi possível obter cDNA a partir do RNA, possibilitando assim a realização da PCR quantitativa em tempo real (RT qPCR).

A RT qPCR foi realizada de acordo com as informações mínimas para a publicação de dados de PCR quantitativo em tempo real (Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments - MIQE) (BUSTIN et al., 2009). Foi utilizado um termo ciclador (CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler Real-Time PCR Detection System®, Bio-rad). As reações da RT qPCR foram realizadas em placas com poços de 20 µl, contendo 20 ng de cDNA e 1,25 µM de primers (primers forward e reverse já misturados). Cada uma das 3 repetições biológicas foi repetida mais 3 vezes (3 reações), constituindo assim 3 repetições técnicas. Foi incluído um controle negativo (sem cDNA) para cada par de primers, bem como poços preenchidos somente com água, controles necessários para confirmar a ausência de qualquer contaminação.

Os parâmetros de amplificação utilizados foram: desnaturação inicial de 1 minuto a 94 °C; seguido por 40 ciclos compostos por 15 segundos a 94 °C; 20 segundos a 60 °C (anelamento) e 30 segundos a 72 °C (extensão).

A amplificação de um único produto por cada par de primers foi confirmada pela observação da curva de melting. Apenas os primers com amplificação linear e curvas de melting com um pico único foram utilizados nas análises.

Os valores de ciclo de referência (Cycle threshold - Ct) obtidos por meio da RT qPCR foram normalizados utilizando dois genes de referência: o primeiro foi um fator de alongação S-II em *E. grandis* (*E. grandis* transcription elongation factor S-II (OLIVEIRA et al., 2011)); e o segundo uma subunidade complexo adaptador de clatrina em *E. grandis* (*E. grandis* clathrin adaptor complex subunit (CACS) (CASSAN-WANG et al., 2012)).

A partir dos valores de Ct normalizados foi determinada a expressão gênica relativa utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

As expressões gênicas relativas do mesmo transportador de fosfato (nas folhas ou nas raízes) nas condições P+ e P- foram comparadas pelo Teste t utilizando o software SigmaStat 2.03[®] (Softec Inc.).

Experimento II - absorção e translocação de ¹⁴C-glyphosate

Para os experimentos de absorção e translocação de ¹⁴C-glyphosate, o processo de semeadura, transplante e cultivo de *E. grandis* foram semelhantes ao descrito anteriormente. A partir das mudas já alocadas nos vasos, foram selecionadas plantas com 6 pares de folhas verdadeiras e tamanho e desenvolvimento uniformes. A lavagem das raízes e aclimação ao sistema hidropônico anteriormente descrito também foram realizados. As plantas foram submetidas aos tratamentos P+ e P- por 5 dias.

Após esse período as plantas foram colocadas sobre tiras de papel de filtro umedecidas com solução nutritiva (P+ ou P-) e alocadas sobre placas de Petri no interior de caixas de plástico. A função do papel de filtro foi manter as raízes das plantas em contato com a solução nutritiva durante o experimento.

O ¹⁴C-glyphosate foi misturado a uma formulação comercial de glyphosate (Roundup PRO[®], Monsanto Company) para preparar uma emulsão com atividade específica 0,1 µCi uL⁻¹ e uma concentração final de 720 g e.a. L⁻¹ (em 200 L ha⁻¹). Essa emulsão foi aplicada na superfície adaxial das folhas (aplicação foliar) ou na raiz principal (aplicação radicular) das plantas de eucalipto. Tanto nas folhas como na raiz, foi utilizada um gota contendo 1 µL da emulsão de glyphosate.

As 1; 4; 8; 24; 48; 72 e 96 horas após a aplicação (HAA), o glyphosate não absorvido foi removido superficialmente da folha ou das raízes por meio da lavagem superficial da área aplicada com 3 mL de acetona 50% (v/v). A acetona resultante da lavagem foi misturada a 5 mL de coquetel líquido cintilador em vials, e esses foram analisados quanto à presença de radioatividade, utilizando um espectrômetro de cintilação líquida (LS6500[®], Beckman Coulter Inc.).

Após a retirada do glyphosate não absorvido, as plantas foram secas com papel absorvente, prensadas entre duas folhas de papel e secas em estufa (50 °C por 4 dias). Após essa etapa, as plantas foram novamente prensadas, mas dessa vez contra uma placa de armazenamento de radioatividade (25 cm x 12,5 cm) por 4

dias a -80 °C. Após esse período, as placas foram escaneadas para análise da dispersão de radioatividade.

Após serem escaneadas, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz e colocadas em vials com 5 mL de coquetel líquido cintilador. Após um período mínimo 24 horas, as amostras foram analisadas quanto à presença de radioatividade, utilizando o mesmo espectrômetro de cintilação líquida supracitado.

Foram realizadas 3 repetições (três plantas por tempo de avaliação). O experimento de absorção foliar foi realizado 3 vezes. Já o experimento de absorção radicular foi realizado apenas uma vez.

Os dados obtidos foram analisados pelo Teste t utilizando o software SigmaStat 2.03[®] (Softec Inc.) comparando a absorção e a translocação de ¹⁴C-glyphosate entre os tratamentos P- e P+.

Experimento III – absorção de ¹⁴C-glyphosate em protoplastos

Plantas de eucalipto foram cultivadas in vitro a partir de folhas de *E. grandis* utilizando o meio de cultivo LS (LINSMAIER; SKOOG, 1965) em caixas de plástico transparentes (12,0 x 6,0 cm).

Para a obtenção dos protoplastos, foram utilizadas folhas tenras com cerca de 3,0 cm de comprimento e 2,0 cm de largura. Em uma folha de papel, folhas de eucalipto foram cortadas “como uma escama de peixe” e imediatamente imersas com a superfície abaxial para baixo em uma solução 0,5 M de manitol distribuída sobre uma placa de Petri. A placa de Petri com as folhas foi então colocada em uma estufa a 30 °C, sobre um rotor com 20 rpm de rotação e no escuro, por 1 hora.

Ao final desse período, a solução 0,5 M de manitol foi aspirada e substituída por uma solução para digestão da parede celular (20 mM de MES; 0,5 M de manitol; 20 mM de KCl; 1,0% celulase; 1,0% macerozyme; 0,5% pectoliase e 1,0% albumina de soro bovino).

A placa de Petri foi novamente colocada na estufa, nas mesmas condições anteriormente descritas, mas por no mínimo 6 horas. Ao final do período de digestão, as folhas foram delicadamente colocadas em uma nova placa de Petri (contendo uma solução chamada MMG, composta por 0,5 M de manitol; 4,0 mM de

MES e 15,0 mM de $MgCl_2$). A placa foi gentilmente agitada para a liberação dos protoplastos.

Os protoplastos foram purificados por flutuação: em um tubo tipo Falcon foi previamente adicionada uma solução de sucrose a 21,0% e, no topo desta, a solução contendo os protoplastos. O tubo foi centrifugado a 60 x g por 4 minutos. Ao final da centrifugação, apenas a camada sobrenadante (que continha os protoplastos maiores e intactos) foi transferida para novos tubos Falcon.

Amostras de 20 μ L foram transferidas para uma câmara de Neubauer, onde foram determinados o número e o tamanho dos protoplastos.

Suspensões de protoplastos foram incubadas com ^{14}C -glyphosate ou NaH_2PO_4 ou ambos por 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; e 25 minutos. Para cada tempo avaliado, 3 repetições foram realizadas.

Após cada período, a suspensão celular (com ^{14}C -glyphosate, NaH_2PO_4 ou ambos) foi transferida para tubos Eppendorf. Esses tubos foram previamente preparados, e continham 50 μ L de Percoll a 33,0% (diluído em solução MMG) e 200 μ L de óleo de silicone (DENIS; DELROT, 1993; RUITER; MEINEN, 1996). Os tubos Eppendorf foram centrifugados por 40 segundos a 2000 x g. Ao final da centrifugação, os protoplastos formavam um pellet levemente esverdeado no fundo do tubo, juntamente com o óleo de silicone. O pellet e o material sobrenadante foram então transferidos para vials de vidro (separadamente).

Em cada vial foram adicionados 5 mL de coquetel de cintilação. Os vials permaneceram em repouso por no mínimo 24 horas e, posteriormente, foram analisados quanto à presença de radioatividade em um espectrômetro de cintilação líquida (LS6500[®], Beckman Coulter Inc.).

Os dados foram expressos graficamente em função do tempo, por meio da média e o desvio padrão da média.

RESULTADOS

Experimento I – expressão gênica de transportadores de fosfato

O transportador de *A. thaliana* AT5G43350 é um transportador de fosfato de alta afinidade e na árvore filogenética, agrupou-se aos possíveis transportadores de fosfato em *E. grandis* Eg104414509 e Eg104456106 (Figura 1).

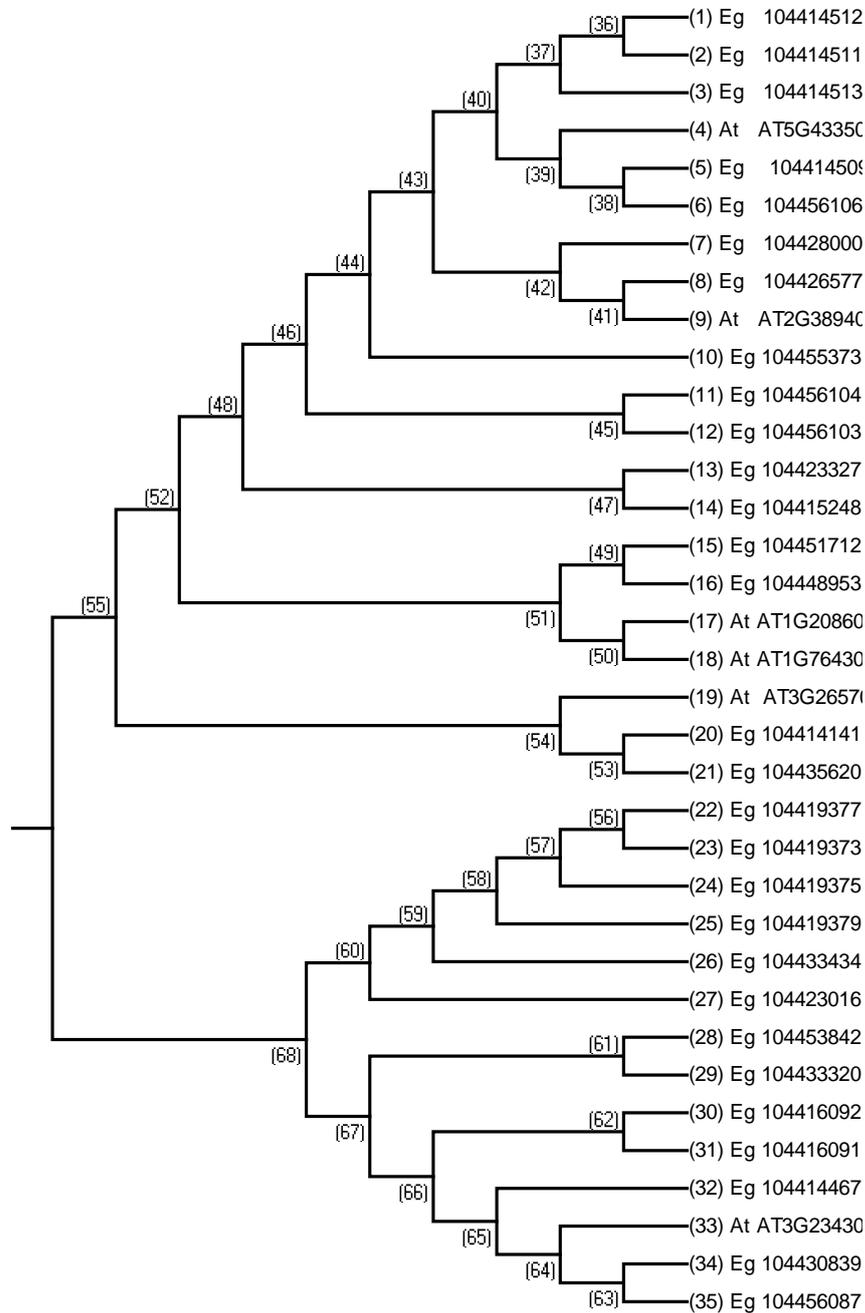


Figura 1. A árvore filogenética que apresenta as relações evolucionárias entre os transportadores de fosfato de *Eucalyptus grandis* (Eg) e *Arabidopsis thaliana* (At).

Uma vez que o grupo vizinho foi bem próximo ao AT4G43350, o Eg104414513 também foi incluído nessa categoria. Para esse agrupamento, a porcentagem de bootstrap foi de cerca de 40,0% (Figura 1).

Os transportadores de fosfato de *A. thaliana* AT2G38940 e AT3G26570 (ambos transportadores de baixa afinidade) encontraram-se bem distanciados na árvore filogenética. A partir deles, os possíveis transportadores de fosfato em *E. grandis* selecionados foram: Eg104428000; Eg104426577; Eg104455373 (porcentagem de bootstrap entre 42,0 e 44,0%, respectivamente), e Eg104414141 e Eg104435620 (porcentagem de bootstrap de 53,0%).

Os possíveis transportadores Eg104451712 e Eg104448953 foram selecionados em *E. grandis* pela sua proximidade com os transportadores de fosfato pertencentes a família “PHT1” de *A. thaliana* AT1G220860 e AT1G76430. Essa porcentagem de bootstrap foi de 51,0%. Por fim, o transportador de fosfato das raízes para o xilema (PHO1) em *A. thaliana* AT3G23430 alinhou-se a sequência de aminoácidos Eg104414467 com porcentagem de bootstrap de 65,0% (Figura 1).

Primers foram desenhados a partir das sequências de aminoácidos selecionadas, (Tabela 1).

Tabela 1. Primers dos transportadores de fosfato utilizados para a RT qPCR.

Sequências dos primers (forward/reverse)	
Eg104414141	CAACTGGAGATAGTGTACGGG / GTGAGCGAATGACATGAAGC
Eg104414467	AGACGGGAATGGTGAAGTTC / CTGGATGAGAGGGTTTCGTG
Eg104414509	AGGTAGATCGGCTCATCCGC / GGCAATGTCCAGTAGGAACCAAG
Eg104426577	CTGTCTCTGTCCACTACTGC / GCCTACTGACAACCCAACTT
Eg104428000	CGAAGACCATGAACGCAATTG / ACCACTACAAACCCGATGC
Eg104435620	TGATCCATCCCAACCAAAGC / GCCGAGAGAACCTGCATGTA
Eg104448953	TTTGAGGTTGCGCGTTTACA / GCCATGAAGAAGAATCCGACA
Eg104451712	CGTTTATTTCTCCATCGGAGTGC / GCGAAGAAGGATGTCAGTGCG
Eg104455373	TGGGATCGGGATGAGGAACT / GCTTGATTCTCAGCCTCTTCAC
Eg104456106	GGTATTGGTTCACTGTCGCG / GATGGCGATGGCAAACATGA
Eg104414513	TGAGGTTAGTGTGATTGCCAG / GCGATCACAATTGCGGTGAA

De acordo com a expressão gênica relativa dos transportadores de fosfato selecionados nas folhas de *E. grandis*, o transportador Eg104414467 foi expresso em maior quantidade na presença de fósforo (P+) (Figura 2).

Já os transportadores Eg104414141, Eg104435620, Eg104428000, Eg104426577 e Eg104455373 não apresentaram alterações em sua expressão em função dos tratamentos presença e ausência de fósforo nas folhas (Figura 2). Dentre esses transportadores, o Eg104435620 e Eg104428000 apresentaram as maiores expressões relativas, alcançando 4,5 e 4,0, respectivamente.

Os transportadores Eg104451712, Eg104448953, Eg104414509, Eg104414513 e Eg104456106 foram significativamente expressos em maior quantidade nas folhas de *E. grandis* das plantas cultivadas sem fósforo (P-).

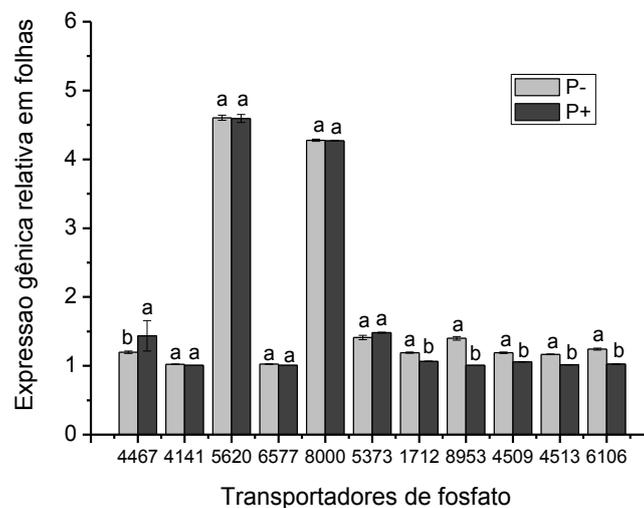


Figura 2. Expressão gênica relativa de transportadores de fosfato nas folhas de *Eucalyptus grandis* por RT-qPCR. As plantas foram submetidas aos tratamentos P- and P+ por 5 dias. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

Já para a expressão gênica relativa dos transportadores de fosfato nas raízes das plantas de *E. grandis*, não houve diferença significativa entre os tratamentos P+ e P- para o transportador Eg104426577 (Figura 3).

Os transportadores Eg104414141, Eg104435620 e Eg104455373 foram expressos em maior quantidade nas raízes das plantas cultivadas com fósforo (P+). Ainda nas raízes, o Eg104428000 foi mais expresso nas plantas submetidas à deficiência de fósforo (P-), e o transportador Eg104414467 não apresentou diferenças nas raízes quanto à presença ou ausência de fósforo.

Já os transportadores Eg104451712, Eg104448953 Eg104414509, Eg104414513 e Eg104456106 foram expressos em maiores quantidades nas plantas submetidas à deficiência de fósforo (P-) (Figura 3).

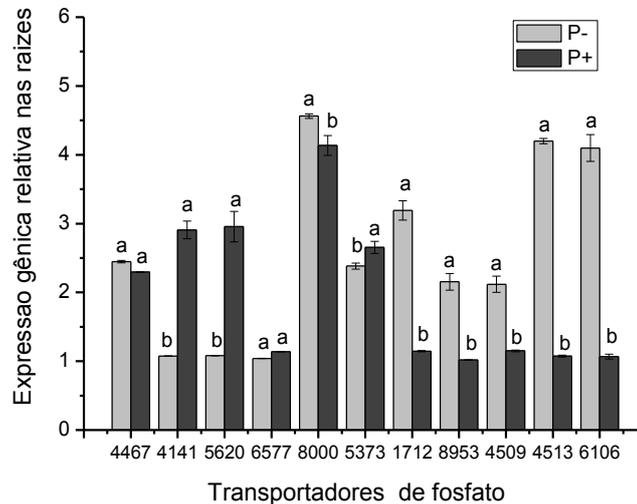


Figura 3. Expressão gênica relativa de possíveis transportadores de fosfato nas raízes de *Eucalyptus grandis* por RT-qPCR. As plantas foram submetidas aos tratamentos P- and P+ por 5 dias. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

Experimento II - absorção e translocação de ^{14}C -glyphosate

Houve comportamento diferenciado na absorção foliar de ^{14}C -glyphosate pelas plantas de eucalipto cultivadas com solução nutritiva completa (P+) e cultivadas com solução nutritiva sem fósforo (P-) as 1; 4; 8; 24; 48; 72 e 96 HAA. Em todos esses momentos, as plantas do tratamento P- absorveram mais ^{14}C -glyphosate que as plantas do tratamento P+, e essa absorção foi maior, respectivamente, em cada uma das avaliações supracitadas (Figura 4).

Logo após a aplicação foliar de glyphosate, as 1 e 4 HAA foram quantificados teores de ^{14}C -glyphosate maiores, respectivamente, nas plantas cultivadas com fósforo (P+). As 24 HAA a presença de fósforo na nutrição das plantas acarretou em teores de ^{14}C -glyphosate quase maiores.

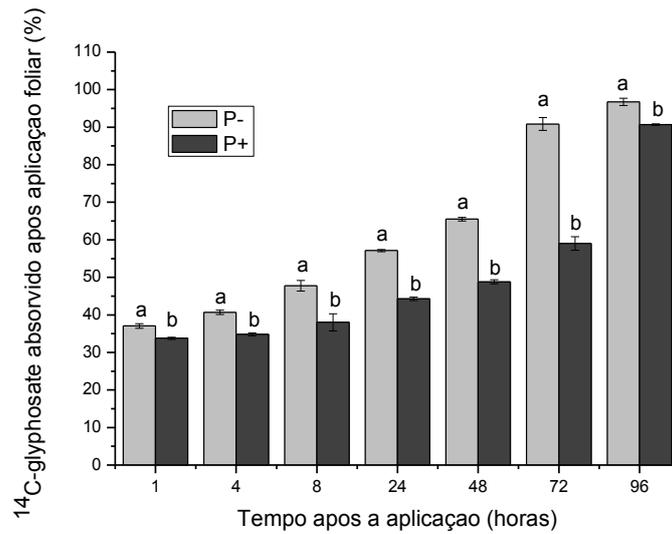


Figura 4. Absorção foliar de ¹⁴C-glyphosate em *Eucalyptus grandis* as 1, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação (HAA), expressa a partir da porcentagem de radiação recuperada. As barras verticais representam os valores de desvio padrão da média.

Entretanto, as 72 e 96 HAA a ausência de fósforo na nutrição das plantas durante 5 dias proporcionou um acúmulo de ¹⁴C-glyphosate maior na parte aérea das plantas de eucalipto (Figura 5).

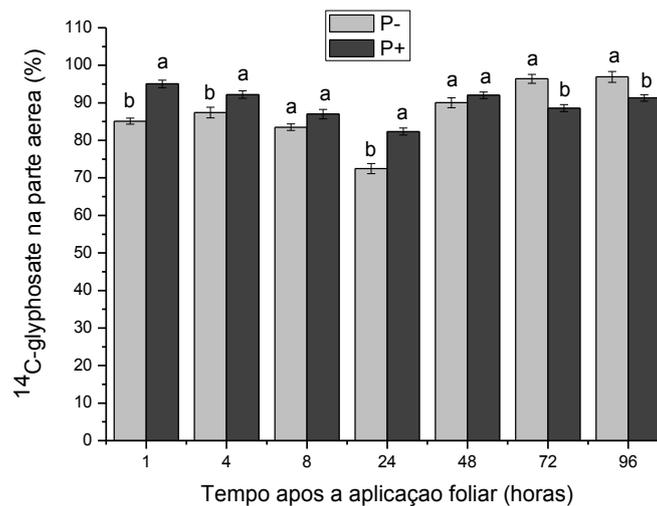


Figura 5. Acúmulo de ¹⁴C-glyphosate na parte aérea de *Eucalyptus grandis* as 1, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação (HAA) foliar, expresso a partir da porcentagem total aplicada. As barras verticais representam os valores de desvio padrão da média.

Já nas raízes das plantas, o acúmulo de ^{14}C -glyphosate foi maior nas plantas cultivadas na ausência de fósforo (P-) as 1; 4; 8 e 24 HAA, respectivamente. Contudo, as 72 e 96 HAA o acúmulo de ^{14}C -glyphosate foi cerca de 65,0% maior nas plantas cultivadas com fósforo (P+) (Figura 6).

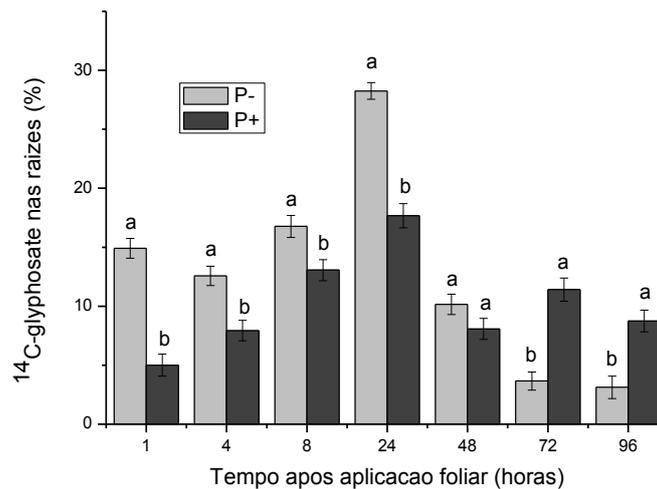


Figura 6. Acúmulo de ^{14}C -glyphosate nas raízes de *Eucalyptus grandis* as 1, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação (HAA) foliar, expressa a partir da porcentagem total aplicada. As barras verticais representam os valores de desvio padrão da média.

As autorradiografias corroboram os dados já apresentados de absorção e translocação de ^{14}C -glyphosate na parte aérea e nas raízes. Inicialmente a absorção foi maior nas plantas do tratamento P+, fato evidenciado pelas autorradiografias com as folhas mais escuras, indicativa da presença do herbicida radiomarcado. Inicialmente, nas plantas do tratamento P+, o ^{14}C -glyphosate ficou mais restrito a parte aérea e foi observado nas raízes apenas as 8 HAA. Já para as plantas dos tratamentos P-, a presença de ^{14}C -glyphosate nas raízes foi observada já a 1 HAA. No entanto, as 72 e 96 HAA as plantas cultivadas com ou sem fósforo apresentaram autorradiografias bastante semelhantes quanto a distribuição de ^{14}C -glyphosate (Figura 7).

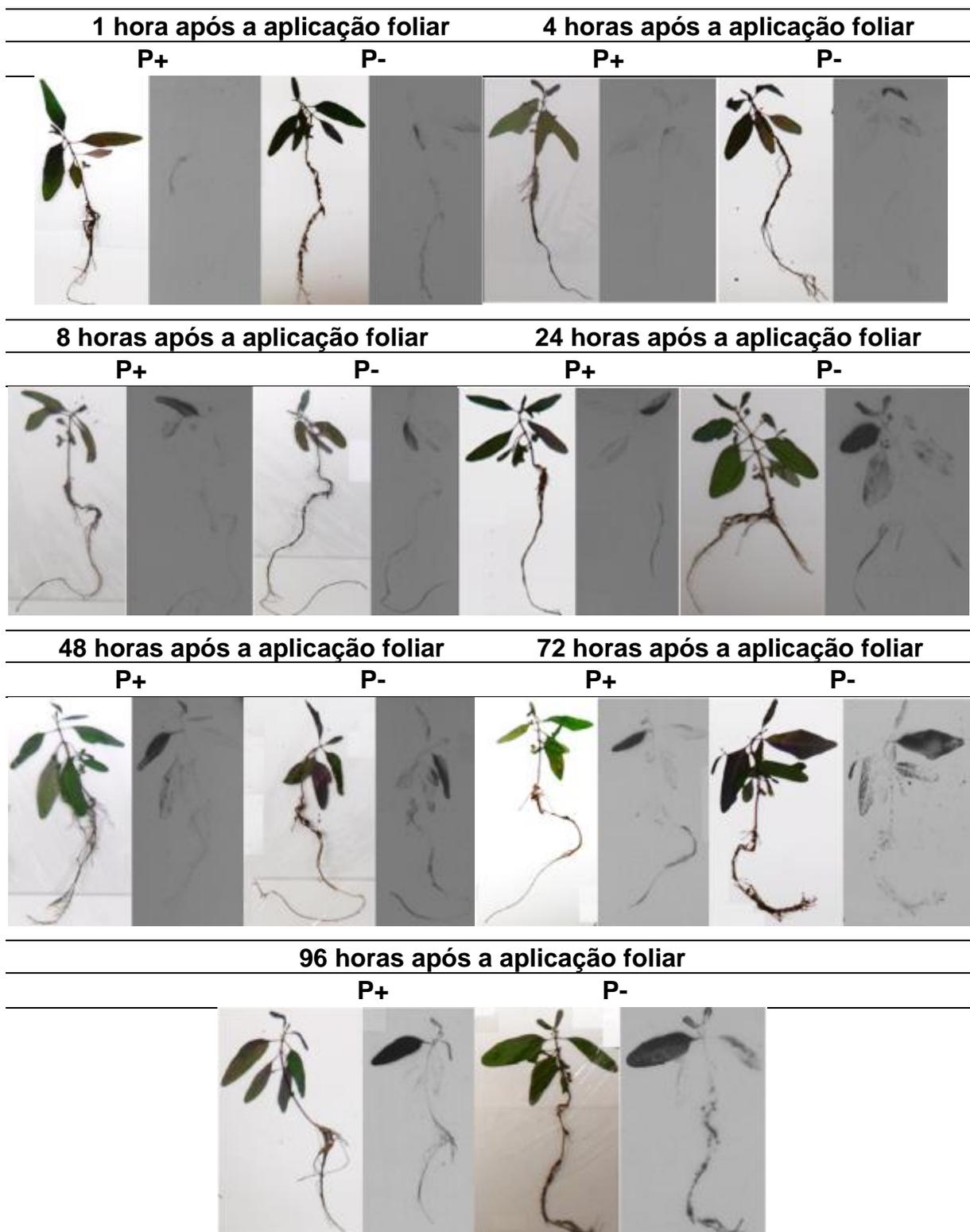


Figura 7. Autorradiografias das plantas de *Eucalyptus grandis* as 1, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação foliar de ^{14}C -glyphosate. Planta pressionada e seca a direita e autorradiografias à esquerda.

A absorção radicular de ^{14}C -glyphosate foi maior nas plantas cultivadas na ausência de fósforo as 1; 4; 8 e 24 HAA. Nessas avaliações, o acúmulo de glyphosate nas raízes foi maior nas plantas submetidas a esse tratamento (P-) (Figura 8).

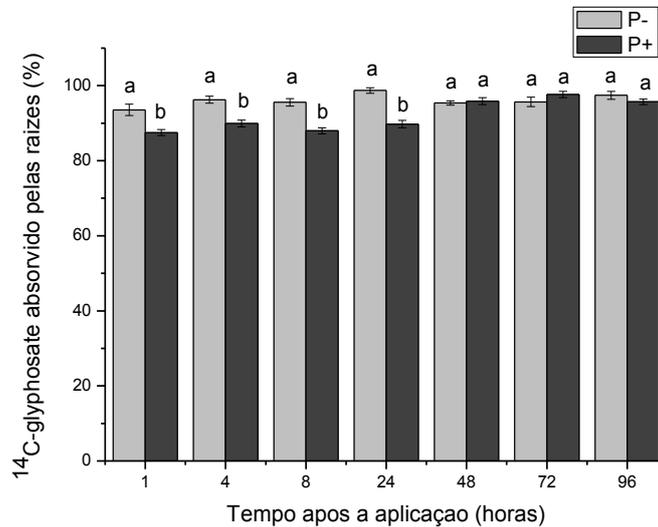


Figura 8. Absorção radicular de ^{14}C -glyphosate em *Eucalyptus grandis* as 1, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação (HAA), expressa a partir da porcentagem de radiação recuperada. As barras verticais representam os valores de desvio padrão da média.

Logo após a aplicação radicular de ^{14}C -glyphosate, as plantas cultivadas sem fósforo translocaram e, conseqüentemente, acumularam mais glyphosate em sua parte aérea. Os teores de ^{14}C -glyphosate as 1; 4 e 8 HAA foram maiores nas plantas de eucalipto do tratamento P-. Já as 24 HAA esse acúmulo nas plantas cultivadas sem fósforo foi de 11,9%. Contudo, as 72 e 96 HAA os teores de glyphosate foram cerca de 6,0% maiores nas plantas cultivadas com fósforo (P+) (Figura 9).

Nas raízes, o acúmulo de ^{14}C -glyphosate foi 95,0% maior nas plantas submetidas à ausência de fósforo (P-) a 1 HAA. Já as 4; 8; 24 e 48 HAA foi quantificado mais glyphosate nas plantas cultivadas com fósforo (P+). Contudo, as 72 e 96 HAA houve uma nova inversão, e as plantas do tratamento P- apresentaram maior quantidade de ^{14}C -glyphosate quando comparadas as plantas do tratamento P+ (Figura 10).

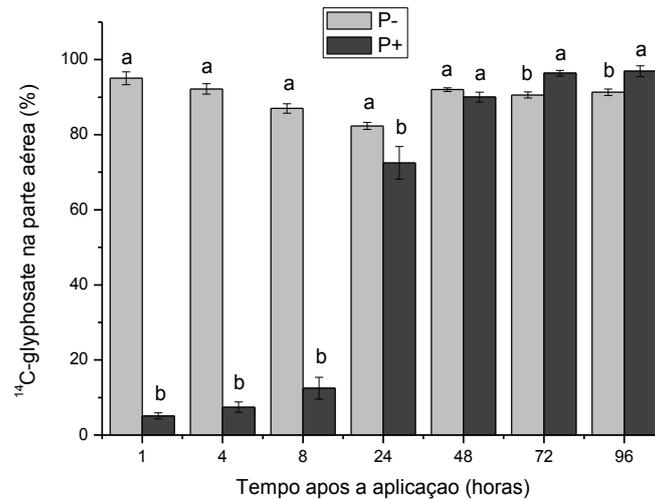


Figura 9. Acúmulo de ^{14}C -glyphosate na parte aérea de *Eucalyptus grandis* as 1, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação (HAA) radicular, expressa a partir da porcentagem total aplicada. As barras verticais representam os valores de desvio padrão da média.

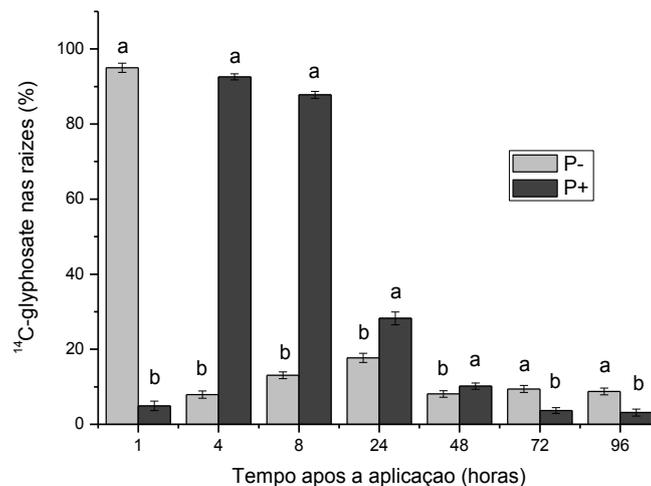


Figura 10. Acúmulo de ^{14}C -glyphosate nas raízes de *Eucalyptus grandis* as 1, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a aplicação (HAA) radicular, expressa a partir da porcentagem total aplicada. As barras verticais representam os valores de desvio padrão da média.

De um modo geral, as autorradiografias indicam que com apenas 1 HAA de ^{14}C -glyphosate já foi possível observar a rápida translocação desse composto por toda a planta submetida ao tratamento P-, enquanto a planta submetida ao tratamento P+ apresentou uma translocação de ^{14}C -glyphosate bem restrita a um

pequeno trecho da raiz principal. As 8 HAA, nas plantas cultivadas com fósforo (P+), a presença de glyphosate ainda estava concentrada apenas no sistema radicular. As 24 HAA, a distribuição de glyphosate foi constatada na planta toda, independentemente do tratamento (P+ ou P-). Contudo, a intensidade de ^{14}C -glyphosate foi muito maior nas folhas da planta submetida a ausência de glyphosate (P-) (Figura 11).

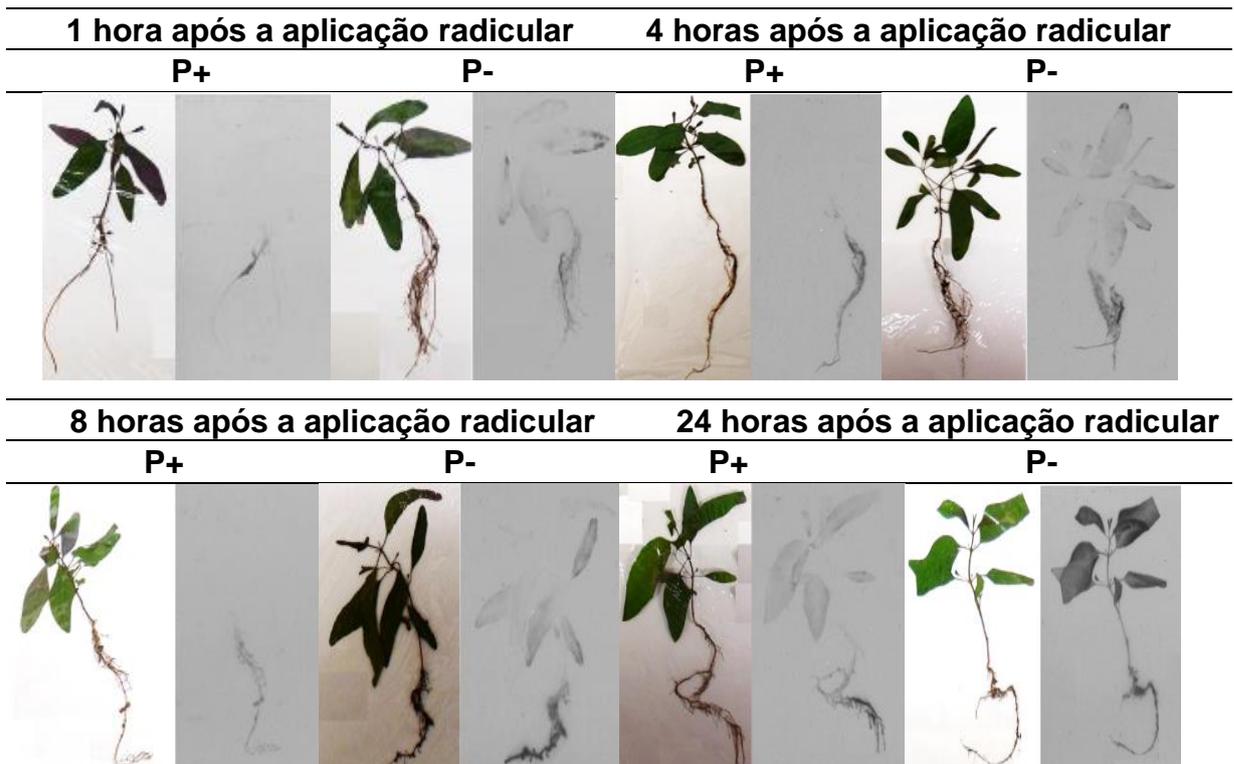


Figura 11. Autorradiografias de plantas de *Eucalyptus grandis* as 1, 4, 8 e 24 horas após a aplicação radicular de ^{14}C -glyphosate. Planta pressionada e seca a direita e autorradiografias à esquerda.

Experimento III – transporte de ^{14}C -glyphosate em protoplastos

A estratégia utilizada para testar a interação entre glyphosate e transportadores de fosfato foi estudar inicialmente a absorção isolada de glyphosate e, em seguida, o efeito de fosfato como um inibidor competitivo de absorção de glyphosate.

De um modo geral, a aplicação de ^{14}C -glyphosate em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1 μCi) indicou a rápida absorção desse composto (que

ocorreu em 0,66 minutos). A absorção de glyphosate se manteve constante até aos 7,5 minutos, apresentando uma ligeira redução no intervalo entre os 7,5 aos 10 minutos, voltando a ser constante até a última avaliação, aos 25 minutos após a aplicação (Figura 12).

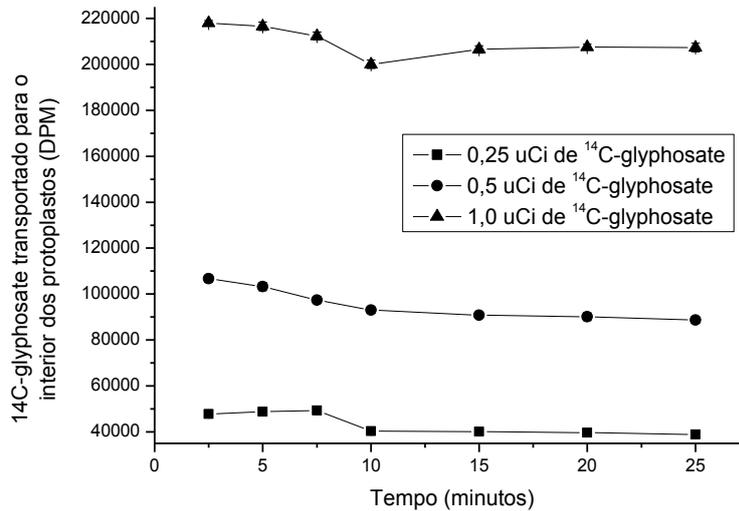


Figura 12. Transporte e retenção de ¹⁴C-glyphosate em protoplastos de *Eucalyptus grandis*. As barras verticais representam os valores de desvio padrão da média.

A aplicação de ¹⁴C- glyphosate com 1 mM de NaH₂PO₄ apresentou resultado bastante semelhante a aplicação de apenas glyphosate, atingindo a saturação após os 0,66 MAA (Figura 13).

À medida que menores concentrações de NaH₂PO₄ foram adicionadas ao meio (concentrações entre 0,01 e 0,5 mM de NaH₂PO₄), a curva de absorção e retenção de glyphosate foi alterada: o aumento da absorção de glyphosate ocorreu lentamente, mas durante todo o período de incubação, e a saturação não foi mais atingida (Figura 13).

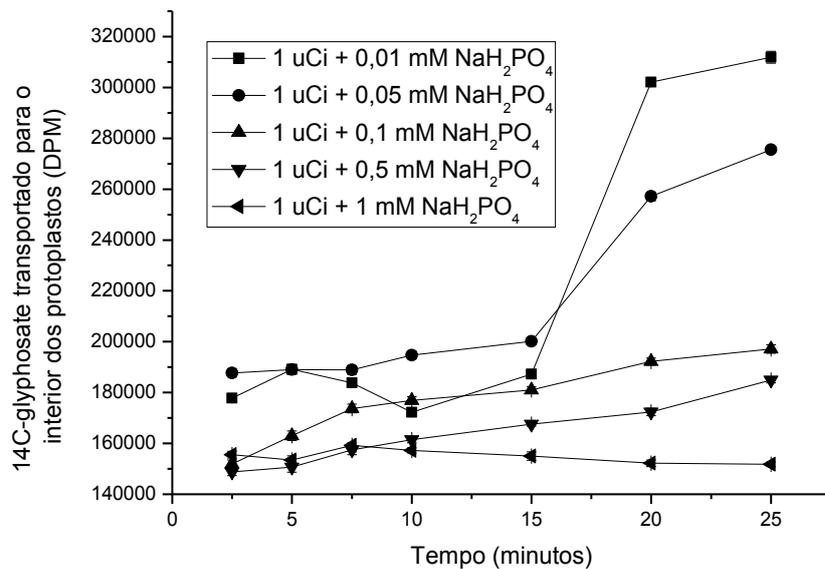


Figura 13. Transporte e retenção de ^{14}C -glyphosate em mistura a NaH_2PO_4 em protoplastos de *Eucalyptus grandis*. As barras verticais representam os valores de desvio padrão da média.

DISCUSSÃO

Expressão gênica de transportadores de fosfato

Uma árvore filogenética construída com o método neighbor-joining permite, a partir da distância entre as diversas sequências de aminoácidos, agrupar “vizinhos” (SAITOU; NEI, 1987). Um par de vizinhos dará origem a um nó interno que passará a representar estas sequências.

Nessa árvore filogenética, os comprimentos dos ramos refletem a diversidade das sequências de aminoácidos. Dessa forma, ramos menores são indicativos de baixa diversidade genética e, conseqüentemente, grande proximidade evolutiva entre as espécies comparadas. Nessa pesquisa, a árvore filogenética resultante do alinhamento das sequências de *A. thaliana* e *E. grandis* apresentou ramos relativamente curtos em todos os agrupamentos, revelando assim a proximidade quanto aos transportadores de fosfato nessas espécies.

Já os números observados próximos dos nós indicam a porcentagem de bootstrap, um parâmetro que reflete a robustez da análise filogenética. De um modo simples, esse número é a probabilidade de ocorrência deste mesmo nó interno a cada 100 réplicas geradas. Os nós presentes entre os “vizinhos” permitem concluir que a porcentagem de bootstrap foi de 40,0 a 65,0%. De um modo geral, para cada 100 árvores geradas por esse programa, entre 40,0 e 60,0 vezes esse aminoácidos foram agrupados dessa mesma forma.

As sequências de aminoácidos de *E. grandis* foram comparadas as de *A. thaliana*, uma vez que muitas pesquisas sobre nutrição estão focadas neste organismo. Além disso, essa espécie não desenvolve associações micorrízicas (ABEL et al., 2002), as quais poderiam alterar a absorção de fósforo. Quando cultivada sob limitação de fósforo, *A. thaliana* desenvolveu sintomas de deficiência de fósforo clássicos, como plantas com pequenas folhas verdes bem escuras, queda das folhas basais, acúmulo de antocianinas, alteração no desenvolvimento radicular e aumento da produção de enzimas para aquisição de fosfato (BATES; LYNCH, 1996).

Os motivos supracitados, bem como a proximidade entre as espécies por meio da árvore filogenética, fazem de *A. thaliana* uma espécie comparativa ideal para esse estudo.

Os transportadores de baixa afinidade (Eg10441414, Eg104435620, Eg104428000, Eg104426577 e Eg104455373) não apresentaram alterações em sua expressão relativa nas folhas, independentemente da presença ou ausência de fósforo. Embora não tenham muitos estudos para esses transportadores, acredita-se que eles sejam produzidos constitutivamente e independentemente da situação nutricional das plantas de eucalipto. Esses transportadores são muito específicos, transportando apenas o fosfato “livre” na planta.

O transportador de fosfato Eg104414467, responsável pelo transporte de fosfato das raízes para o xilema (de acordo com a proximidade de uma sequência de aminoácidos com essa função em *A. thaliana*) foi expresso em maior quantidade nas folhas na presença de fósforo (P+). Já nas raízes, a expressão deste mesmo transportador foi indiferente aos tratamentos. Em *A. thaliana*, essa proteína é conhecida por “PHO1”, e transportadores dessa “família” são responsáveis por

transportar fosfato das raízes para o xilema (HAMBURGER et al., 2002; STEFANOVIC et al., 2007).

Os transportadores Eg104451712 e Eg104448953 apresentaram maior expressão gênica na ausência de fósforo tanto nas folhas como nas raízes de *E. grandis*. Esses transportadores se agruparam aos transportadores de fosfato inorgânico encontrados nas raízes de *A. thaliana* apenas em condições de deficiência de fósforo, também conhecidos como “transportadores PHT1”.

Muchhal, Pardo e Raghothama (1996) afirmaram que a identificação e a análise desses transportadores de alta afinidade são peças importantes na regulação gênica a nível transcricional. A família de transportadores PHT1 é responsável pelo transporte de fosfato pela membrana plasmática, e pode ser dividido em nove “membros”. Dentre as várias adaptações que as plantas têm para se adaptar a deficiência de fósforo, a modulação da expressão gênica dos transportadores PHT1 já foi evidenciada em várias pesquisas (MUDGE et al., 2002; GUO et al., 2008; THIBAUD et al., 2010).

Pesquisas ainda sugerem que a família de transportadores PHT1 exige a presença de um “facilitador” (PHF1) para auxiliar sua saída do retículo endoplasmático e a estabilidade de sua passagem pela membrana plasmática (BAYLE et al., 2011).

Os transportadores considerados de alta afinidade (Eg104414509, Eg104456106 e Eg104414513) apresentaram maior expressão gênica relativa nas folhas e raízes na ausência de fósforo (P-). Em *A. thaliana*, a indução de transportadores de alta afinidade por fosfato em situações de deficiência de fósforo tem como o objetivo aumentar a capacidade de influxo de fosfato (LEE, 1993). Por exemplo, Misson et al. (2005) verificaram que a indução desses transportadores ocorreu apenas 12 horas após o início da imposição da deficiência de fósforo.

O conhecimento das proteínas transportadoras de fosfato nas plantas superiores agruparam essas proteínas em 4 famílias, denominadas PHT1, PHT2, PHT3 e PHT4. Essas famílias são responsáveis pela aquisição e/ou transporte de fosfato pela membrana plasmática, cloroplasto, mitocôndria e complexo de Golgi, respectivamente (CUBERO et al., 2009; GUO et al., 2008; MUDGE et al., 2002; POIRIER; BUCHER, 2002; VERSAW; HARRISON, 2002).

Alguns pesquisadores identificaram alguns fatores que podem colaborar para a indução de proteínas em situação de deficiência de fósforo. Um deles, por exemplo, pode ser traduzido como “resposta à deficiência de fosfato” (phosphate starvation response 1 – PHR1) (RUBIO et al., 2001). No entanto, o mecanismo molecular que regula essa expressão gênica diferenciada ainda é pouco conhecido, e complexo de ser compreendido, uma vez que possivelmente é resultado da alteração de diversas rotas regulatórias na planta (ROUACHED; ARPAT; POIRIER, 2010).

Absorção e translocação de ¹⁴C-glyphosate

A absorção de glyphosate (tanto foliar quanto radicular) foi maior nas plantas submetidas a deficiência de fósforo (5 dias).

Nas folhas, o glyphosate é inicialmente absorvido de forma muito rápida pela cutícula e, em seguida, passa por uma fase de absorção simplástica lenta, que é influenciada por características bastante singulares, como espécie da planta alvo, condições ambientais, concentração do herbicida, surfatante utilizado e método de aplicação (CASELEY; COUPLAND, 1985; FRANZ et al., 1997; MONQUERO et al., 2004).

Já a absorção radicular de glyphosate é um processo pouco estudado, uma vez que no momento em que o glyphosate atinge o solo, a tendência é que o mesmo seja adsorvido à fração coloidal, através de ligações similares às do fosfato inorgânico (PRATA et al., 2000). Quando o glyphosate encontra-se disponível na solução do solo, é degradado rapidamente por microorganismos a AMPA e CO₂ (REGITANO, 2009). Dessa forma, em condições de campo, a absorção radicular de glyphosate por plantas seria praticamente nula, justificando a ausência de pesquisas nessa área.

Nessa pesquisa, as plantas de eucalipto avaliadas são da mesma espécie, foram originadas do mesmo grupo de sementes, cultivadas e mantidas nas mesmas condições. A aplicação de glyphosate também foi realizada da mesma forma (aplicação de uma gota de 1 µL de glyphosate nas folhas ou raízes). Uma vez que a deficiência de fósforo foi a única diferença imposta e por apenas 5 dias, não haveria

tempo suficiente para que as plantas desenvolvessem qualquer modificação que pudesse culminar em alterações na absorção de glyphosate, como mudanças na composição da cera epicuticular foliar (GUIMARÃES et al., 2009; HATTERMAN-VALENTI et al., 2011), por exemplo.

Assim, as diferenças observadas na absorção de glyphosate entre os tratamentos P+ e P- possivelmente podem ser atribuída a transportadores de fosfato de alta afinidade que atuaram na fase de transporte da membrana plasmática, auxiliando na entrada de glyphosate. Denis e Delrot (1993) e Morin et al. (1997) demonstraram que proteínas transportadoras de fosfato presentes na membrana plasmática de *Vicia faba* e *Catharanthus roseus* facilitaram a absorção de glyphosate. Esse fato se torna possível devido a baixa especificidade desse grupo de transportadores, que em uma situação de deficiência de fósforo, podem se ligar ao grupo fosfonato presente no herbicida glyphosate.

Uma vez absorvido, inicia-se a fase de translocação de glyphosate no interior da planta. De um modo geral, a translocação de glyphosate da parte aérea para as raízes (no ensaio de absorção foliar) e das raízes para a parte aérea (ensaio de absorção radicular) foi mais rápida nas plantas do tratamento P-, fato que ficou bastante evidente nas autorradiografias.

Após a penetração do glyphosate através da cutícula e membrana plasmática dos tecidos fotossintetizantes, ocorre a translocação desse herbicida no simplasto, através dos tecidos vasculares, até o sítio de ação do herbicida (SATICHIVI et al., 2000). O transporte de glyphosate via floema é bastante conhecido, e já foi estudado em várias espécies (SPRANKLE et al., 1975; SCHULTZ; BURNSIDE, 1980; SCHULTZ; AMRHEIN, 1984; HONEGGER et al., 1986).

Nessa pesquisa, a translocação de glyphosate foi muito rápida. Após a aplicação radicular, foi observada a translocação de glyphosate por toda a planta em uma hora (plantas do tratamento P-, após a aplicação radicular de glyphosate, por exemplo). Uma das razões pela qual o glyphosate é tão eficiente é sua rápida distribuição no interior das plantas, sabendo-se que seu transporte acontece via apoplasto e via simplasto (GOTTRUP et al., 1976; JACHETTA et al., 1986). No simplasto, o movimento do glyphosate através das intercomunicações do

protoplasma do parênquima e do floema depende principalmente da habilidade do herbicida em penetrar a membrana plasmática (JACHETTA et al., 1986).

Alguns pesquisadores concluíram que essa fase de transporte se dá por absorção passiva não facilitada (GOUGLER; GEIGER, 1981; HONEGGER et al., 1986; IBAOUI et al., 1986). No entanto, dados cinéticos mais detalhados têm mostrado que o glyphosate pode ser absorvido por transportadores de fosfato da membrana plasmática em *Vicia faba* (DENIS; DELROT, 1993). Hetherington et al. (1998) ainda concluíram que o glyphosate pode ser transportado por um mediador ativo facilitando sua absorção. E, ainda seguindo esses pesquisadores, esse mediador é um transportador de fosfato.

Transporte de ¹⁴C-glyphosate em protoplastos

O terceiro experimento desse capítulo consistiu em estudar o transporte de glyphosate via membrana plasmática em protoplastos de *Eucalyptus grandis* e o comportamento desse transporte na presença de uma fonte de fosfato.

A aplicação de concentrações de glyphosate (0,25; 0,5 e 1 μ Ci) sem a adição de fosfato ao meio resultou em uma absorção muito rápida de glyphosate, iniciada cerca de 40 segundos após a aplicação. Uma vez que protoplastos são células sem a parede celular, o transporte de componentes para o meio intracelular normalmente é realizado exclusivamente através da membrana, na qual se encontram os transportadores de fosfato.

Dada a afinidade desses transportadores ao fosfato e a ausência de uma fonte de fósforo no meio, provavelmente a rápida absorção de glyphosate (transporte através da membrana) se deva a afinidade dos transportadores pelo fosfanato presente no herbicida. Por outro lado, a adição de fosfato na suspensão de protoplastos pode ter ocasionado a saturação dos transportadores, já que outra forma de fosfato estava disponível no meio, limitando o transporte do glyphosate.

Independentemente da concentração de glyphosate utilizada, a curva de absorção apresentou um pico de absorção (40 segundos), uma ligeira redução da absorção de glyphosate, seguida por uma fase constante de absorção, que pode ser

indicativa da saturação dos transportadores pelo glyphosate ou do equilíbrio se sua concentração entre o meio intra e extracelular.

A ausência de um pico de absorção pronunciado possivelmente indicou que a absorção de glyphosate pelos protoplastos – na ausência de qualquer fonte de fosfato - ocorreu devido à difusão simples, fato também observado por Gougle e Geiger (1981); Ibaoui et al. (1986) e Ruitter e Meinen (1996). A absorção linear de glyphosate já foi anteriormente constatada em protoplastos de *Vicia faba* em concentrações de glyphosate de até 100 μM (DENIS; DELROT, 1993).

A aplicação de ^{14}C -glyphosate com 1 mM de NaH_2PO_4 apresentou resultado bastante semelhante à aplicação de apenas glyphosate, atingindo a saturação logo após o pico de absorção. Possivelmente, na presença dessa concentração de fosfato houve a absorção preferencial de fosfato, e o glyphosate foi absorvido em pouca quantidade e secundariamente (sua absorção consistiu em torno de 125000 DPM). Uma vez que essa concentração é relativamente alta para uma suspensão celular, as células foram supridas continuamente (ao menos ao longo dos 30 minutos avaliados) por fosfato e o transporte ativo de glyphosate não foi ativado.

À medida que menores concentrações de NaH_2PO_4 foram adicionadas ao meio, a curva de absorção de glyphosate foi alterada: o aumento da absorção de glyphosate ocorreu em função de um maior intervalo de tempo após a aplicação, e a saturação não foi mais atingida. Isso provavelmente indicou que, inicialmente, o fosfato disponível no meio foi transportado para o interior dos protoplastos, e a absorção de glyphosate foi baixa. Com o fim do suprimento de fosfato disponível no meio extracelular, o transporte ativo de glyphosate foi iniciado, atingindo diferentes picos de absorção para as distintas doses de NaH_2PO_4 .

Outras pesquisas que avaliaram a cinética de absorção de glyphosate e compostos fosfatados evidenciaram que o transporte do componente saturável do glyphosate foi competitivamente inibido por fosfato ou ácido fosfonofórmico (HETHERINGTON et al., 1998; DENIS; DELROT, 1993), potentes inibidores do transporte de fosfato também em células animais.

O glyphosate inibiu a absorção de fosfato em células isoladas de feijão (BRECKE; DUKE, 1980). O fosfato de potássio reduziu a absorção de glyphosate por células de batata (MERVOSH; BALKE, 1991).

O glyphosate foi transportado por transportadores de fosfato da membrana plasmática de células de *Catharanthus roseus*, e esse transporte foi inibido com o uso de inibidores de enzimas transportadoras de prótons, sugerindo que há um co-transporte com H^+ ao longo de um gradiente de potencial gerado pela H^+ -ATPase (MORIN et al., 1997).

Segundo Fitzgibbon e Braymer (1988), a absorção de glyphosate foi induzida pela deficiência de fósforo em *Pseudomonas* sp. Strain PG2982. Ainda segundo esses autores, esse fenômeno pode ser atribuído ao sistema transportador de fosfato, que tem uma ampla especificidade pelo seu substrato (grupos fosfato).

Os dados obtidos nesta pesquisa, junto com os estudos citados, permitiram relacionar a absorção de glyphosate com os transportadores de fosfato da membrana plasmática que reconhecem o grupo fosfonato da molécula de glyphosate. No entanto, o complexo transporte de glyphosate nas plantas ainda não é completamente conhecido. Mesmo o conhecimento do transporte de fósforo nas plantas ainda é limitado, reforçando a necessidade de mais estudos futuros.

Muitas pesquisas já indicaram que a absorção ativa de glyphosate foi possivelmente mediada por um transportador de fosfato. No entanto, essa é a primeira pesquisa onde esse fato foi constatado para uma espécie perene, como o eucalipto, e diretamente influenciada tanto pelo fósforo (grande parte das áreas florestais são cultivada em solos com carência desse nutriente) e pelo glyphosate (herbicida muito utilizado ao longo de todo o ciclo do eucalipto).

CONCLUSÕES

Em *Eucalyptus grandis*, a expressão gênica dos transportadores de fosfato foi alterada em resposta à deficiência de fósforo, e a expressão de transportadores de alta afinidade foi incrementada pela deficiência desse nutriente. A absorção de ^{14}C -glyphosate aplicado via foliar ou radicular foi maior nas plantas submetidas à deficiência de fósforo, e a translocação do herbicida foi mais rápida nessas plantas. O transporte de ^{14}C -glyphosate ocorreu de modo mais lento quando NaH_2PO_4 foi adicionado à suspensão de protoplastos. Contudo, com a redução do conteúdo de

fosfato extracelular, o glyphosate foi transportado para o interior dos protoplastos, indicando a ação de transportadores de fosfato de alta afinidade.

REFERÊNCIAS

ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A. Phosphate sensing in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n. 1, p. 1-8, 2002.

BATES, T. R.; LYNCH, J. P. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. **Plant, Cell & Environment**, v. 19, n. 5, p. 529-538, 1996.

BAYLE, V.; ARRIGHI, J.; CREFF, A.; NESPOULOUS, C.; VIALARET, J.; ROSSIGNOL, M.; GONZALEZ, E.; PAZ-ARES, J.; NUSSAUMEA, L. *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. **The Plant Cell**, v. 23, p. 1523–1535, 2011.

BRECKE, B. J.; DUKE, W. B. effect of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. **Plant Physiology**, v. 66, p. 656-659, 1980.

CALDERON-VAZQUEZ, C.; IBARRA-LACLETTE, E.; CABALLERO-PEREZ, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transcript profiling of *Zea mays* roots reveals gene responses to phosphate deficiency at the plant and species-specific levels. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 2479–2497, 2008.

CASELEY, J. C.; COUPLAND, D. Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake movement and acidity. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. A. **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 92-123.

CASSAN-WANG, H.; SOLER, M.; YU, H.; CAMARGO, E. L.; CAROCHA, V.; LADOUCE, N.; SAVELLI, B.; PAIVA, J. A.; LEPLÉ, J. C.; GRIMA-PETTENATI, J. Reference genes for high-throughput quantitative reverse transcription–PCR analysis of gene expression in organs and tissues of *Eucalyptus* grown in various environmental conditions. **Plant & Cell Physiology**, v. 53, n. 12, p. 2101-2116, 2012.

CUBERO, B.; NAKAGAWA, Y.; JIANG, X. Y.; MIURA, K. J.; LI, F.; RAGHOTHAMA, K. G.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. The phosphate transporter PHT4;6 is a determinant of salt tolerance that is localized to the golgi apparatus of *Arabidopsis*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 2, p. 535–552, 2009.

- DENIS, M. H.; DELROT, S. Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. **Physiologia Plantarum**, v. 87, p. 569-575, 1993.
- DEWEY, S. A.; APPLEBY, A. P. A comparison between glyphosate and assimilate translocation patterns in tall morning glory (*Ipomoea purpurea*). **Weed Science**, v. 31, p. 308-314, v. 1983.
- FITZGIBBON, J.; BRAYMER H. D. Phosphate starvation induces uptake of glyphosate by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1886-1888, 1988.
- FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate: a unique global herbicide**. Washington DC: American Chemical Society, 1997. 678 p.
- GOTTRUP, O.; O'SULLIVAN, P. A.; SHRAA, R. J.; VANDEN, W. H. Uptake, translocation, metabolism and selectivity of glyphosate in Canada thistle and leafy spurge. **Weed Research**, v. 16, p. 197, 1976.
- GOUGLER, J. A.; GEIGER, D. R. Uptake and distribution of N-(phosphonomethyl) glycine in sugar beet plants. **Plant Physiology**, v. 68, p. 668-672, 1981.
- GUIMARÃES, A. A.; FERREIRA, E. A.; VARGAS, L. SILVA, A. A.; VIANA, R. G.; DEMUNER, A. J.; CONCENÇO, G.; ASPIAZU, I.; GALON, L.; REIS, M. R.; SILVA, A. F. Chemical composition of the epicuticular wax of Italian ryegrass biotypes resistant and susceptible to glyphosate. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 149-154, 2009.
- GUO, B.; JIN, Y. H.; WUSSLER, C.; BLANCAFLOR, E. B.; MOTES, C. M.; VERSAW, W. K. Functional analysis of the *Arabidopsis* PHT4 family of intracellular phosphate transporter. **New Phytologist**, v. 177, p. 889-898, 2008.
- HAMBURGER, D.; REZZONICO, E.; MACDONALD-COMBER PETÉTOT, J.; SOMERVILLE, C.; POIRIER, Y. Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. **The Plant Cell**, v. 14, p. 889-902, 2002.
- HAMMOND, J. P.; BENNETT, M. J.; BOWEN, H. C.; BROADLEY, M. R.; EASTWOOD, D. C.; MAY, S. T.; RAHN, C.; SWARUP, R.; WOOLAWAY, K. E.; WHITE, P. J. Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. **Plant Physiology**, v. 132, p. 578-586, 2003.

HATTERMAN-VALENTI, H.; PITY, A.; OWEN, M. Environmental effects on velvet leaf (*Abutilon theophrasti*) epicuticular wax deposition and herbicide absorption. **Weed Science**, v. 59, n. 1, p. 14-21, 2011.

HETHERINGTON, P. R.; MARSHALL, G.; KIRKWOOD, R. C.; WARNER, J. M. Absorption and efflux of glyphosate by cells suspensions. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 320, p. 527-533, 1998.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347 p.

HONEGGER, J. L. Glyphosate transport in plants. In: CORNSHAW, J.; LUCAS, W. J.; GIAQUINTA, R. T. **Phloem transport**. New York: Liss, 1986. p. 216-268.

IBAOUI, H. E.; DELROT, S.; BESSON, J.; BONNEMAIN, J. L. Uptake and release of a non phloem-mobile (iprodione) xenobiotic by broadbean leaf tissues. **Physiologie Vegetale**, v. 24, p. 431-442, 1986.

JACHETTA, J. J.; APPLEBY, A. P.; BOERSMA, D. L. Apoplastic and symplastic pathways of atrazine and glyphosate transport in shoots of seedlings sunflower. **Plant Physiology**, v. 82, n. 4, p. 1000-1007, 1986.

JAIN, A.; POLING, M. D.; KARTHIKEYAN, A. S.; BLAKESLEE, J. J.; PEER, W. A.; TITAPIWATANAKUN, B.; MURPHY, A. S.; RAGHOTHAMA, K. G. Differential effects of sucrose and auxin on localized phosphate deficiency-induced modulation of different traits of root system architecture in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 144, n. 1, p. 232–247, 2007.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LEE, R. B. Control of net uptake of nutrients by regulation of influx in barley plants recovering from nutrient deficiency. **Annals of Botany**, v. 72, p. 223–230, 1993.

LI, K.; XU, C.; LI, Z.; ZHANG, K.; YANG, A.; ZHANG, J. Comparative proteome analyses of phosphorus response in maize (*Zea mays* L.) roots of wild-type and a low-P-tolerant mutant reveal root characteristics associated with phosphorus deficiency. **Plant Journal**, v. 55, p. 927–939, 2008.

LI, K.; XU, C.; ZHANG, K.; YANG, Y.; ZHANG, J. Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. **Proteomics**, v. 7, p. 1501–1512, 2007.

LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 18, n. 1, p. 100–127, 1965.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MARTIN, R. A.; EDGINGTON, L. V. Comparative systemic translocation of several xenobiotics and sucrose. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 16, p. 87-96, 1981.

MERVOSH, T. L.; BALKE, N. E.. Effects of calcium, magnesium, and phosphate on glyphosate absorption by cultured plant cells. **Weed Science**, v. 39, p. 347-353, 1991.

MISSION, J.; RAGHOTHAMA, K. G.; JAIN, A.; JOUHET, J.; BLOCK, M. A.; BLIGNY, R.; ORTET, P.; CREFF, A.; SOMERVILLE, S.; ROLLAND, N.; DOUMAS, P.; NACRY, P.; HERRERRA-ESTRELLA, L.; NUSSAUME, L.; THIBAUD, M. C. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 11934–11939, 2005.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; OSUNA, M. D.; DE PRADO, R. A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.

MORIN, F.; VERA, V.; NURIT, F.; TISSUT, M.; MARIGO, G. Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: role of a phosphate transporter. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 58, p. 13-22, 1997.

MORCUENDE, R.; BARI, R.; GIBON, Y.; ZHENG, W.; PANT, B. D.; BLASING, O.; USADEL, B.; CZECHOWSKI, T.; UDVARDI, M. K.; STITT, M.; SCHEIBLE, W. R. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 85–112, 2007.

MUCHHAL U. S.; PARDO J. M.; RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 10519–10523, 1996.

MUDGE, S. R.; RAE, A. L.; DIATLOFF, E.; SMITH, F. W. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 31, p. 341–353, 2002.

OLIVEIRA, L. A.; BRETON, M. C.; BASTOLLA, F. M.; CAMARGO, R. M.; FRAZZON, J.; PASQUALI, G. Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species. **Plant & Cell Physiology**, v. 53, n. 2, p. 405–422, 2012.

PIPKE, R.; AMRHEIN, N. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter utracvaneus* ATCC 13752. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1293-1296, 1988.

PIPKE, R.; SCHULZ, A.; AMRHEIN, N. Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter* sp.. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 974–978, 1987.

POIRIER, Y.; BUCHER, M. Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. **The Arabidopsis Book**, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3243343/>>. Acesso em: 30 abr. 2016.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L. Degradação e adsorção de diuron em solos tratados com vinhaça. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 217-223, 2000.

RAGHOTHAMA, K. G.; KARTHIKEYAN, A. S. Phosphate acquisition. **Plant Soil**, v. 274, p. 37–49, 2005.

REGITANO, J. B. Sorção e dessorção do glyphosate no solo. In: VELINI, E. D.; MESCHEDE, D. K.; CARBONARI, C. A.; TRINDADE, M. L. B. **Glyphosate**. Botucatu: Fepaf, 2009. p. 153-178.

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

RIECHERS, D. E.; WAX, D. E.; LIEBL, R. A.; BUSH, D. R. Surfactant increased glyphosate uptake into plasma membrane vesicles isolated from common lambsquarters leaves. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1419-1425, 1994.

ROUACHED, H.; ARPAT, A. B.; POIRIER, Y. Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. **Molecular Plant**, v. 3, p. 288–299, 2010.

RUBIO, V.; LINHARES, F.; SOLANO, R.; MARTIN, A. C.; IGLESIAS, J.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. **Genes & Development**, v. 15, p. 2122–2133, 2001.

RUITER, H.; VERBEEK, M. A. M.; UFFING, A. J. M. Mode of action of a nonionic and a cationic surfactant in relation to glyphosate. In: CROSS, B.; SCHER, H. B. **Pesticide Formulations, Innovations and Developments**. Washington DC: American Chemical Society. 1988. p. 44-55.

RUITER, H.; MEINEN, E. Adjuvant-increased glyphosate uptake by protoplasts isolated from quackgrass *Elytrigia repens* (L.) Nevski. **Weed Science**, v. 44, p. 38-45, 1996.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, n. 4, v. 4, p. 406-425, 1987.

SATICHIVI, N. M.; WAX, L. M.; STOLLER, E. W.; BRISKIN, D. P. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**, v. 48, p. 675-679, 2000.

SCHULTZ, M. E.; AMRHEIN, N. Glyphosate induced accumulation of shikimic acid in tomato plants in relation to the translocation of glyphosate. **Plant Physiology**, v. 75, p. 37-49, 1984.

SCHULTZ, M. E.; BURSIDE, O. C. Absorption, translocation, and metabolism of 2,4-D and glyphosate in hemp dogbane (*Apocynum cannabinum*). **Weed Science**, v. 28, p. 13- 20, 1980.

SHERRICK, S. L.; HOLT, H. A.; HESS, F. D. Absorption and translocation of MON 0818 adjuvant in field bindweed (*Convolvulus arvensis*). **Weed Science**, v. 34, p. 817-823, 1986.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. **Weed Science**, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1975.

STEFANOVIC, A.; RIBOT, C.; ROUACHED, H.; WANG, Y.; CHONG, J.; BELBAHRI, L.; DELESSERT, S.; POIRIER, Y. Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. **The Plant Journal**, v. 50, p. 982–994, 2007.

TAIR - The Arabidopsis Information Resource. Disponível em:<www.arabidopsis.org/aboutarabidopsis.html>. Acesso em: 05 jan. 2016.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

THIBAUD, M. C.; ARRIGHI, J. F.; BAYLE, V.; CHIARENZA, S.; CREFF, A.; BUSTOS, R.; PAZ-ARES, J.; POIRIER, Y.; NUSSAUME, L. Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, n. 64, v. 775–789, 2010.

VERSAW, W. K.; HARRISON, M. H. A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. **Plant Cell**, n. 14, p. 1751–1766, 2002.

WU, P.; MA, L.; HOU, X.; WANG, M.; WU, Y.; LIU, F.; DENG, X.W. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1260–1271, 2003.

WYRILL, J. B.; BURNSIDE, O. C. Absorption, translocation, and metabolism of 2,4-D and glyphosate in common milkweed and hemp dogbane. **Weed Science**, v. 24, p. 557-566, 1976.