

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INTERVALO DE DESSECAÇÃO DE *Urochloa ruziziensis* (R.  
GERMAN & EVRARD) CRINS E SEU EFEITO ALELOPÁTICO  
NA CULTURA DA SOJA RR**

**Mariluce Nepomuceno**

Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL, SP – BRASIL

Março de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INTERVALO DE DESSECAÇÃO DE *Urochloa ruziziensis* (R.  
GERMAN & EVRARD) CRINS E SEU EFEITO ALELOPÁTICO  
NA CULTURA DA SOJA RR**

**Mariluce Nepomuceno**

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

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Varela Montoya**

Tese apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

**JABOTICABAL – SP - BRASIL**

Março de 2011

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelo milagre da vida; e por nos conceder uma natureza tão bela e completa na qual tudo se interage naturalmente.

Ao prof. Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves pela amizade, oportunidades proporcionadas, experiências compartilhadas e por me orientar nesta pesquisa.

Aos membros que compuseram a banca examinadora, prof. Dr. Alberto José Cavaleiro, prof. Dr. Dagoberto Martins, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Salgueiro Lima, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Regina Pimentel de Almeida pelas sugestões e correções apresentadas.

Às prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Pessoa da Cruz Centurion, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Moreli Damasceno Pavani e prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Núbia Maria Correia pelo auxílio em banca na qualificação.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária (UNESP-Jaboricabal), particularmente a José Valcir Fidélis Martins.

À equipe de alunos estagiários de graduação e pós-graduação do LAPDA.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado em Engenharia Agrônômica.

À Universidade de Cádiz, na Espanha, pelo apoio no desenvolvimento de parte desta pesquisa, em especial aos membros do Departamento de Química Orgânica: prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Maria Varela Montoya, prof. Dr. Francisco Antonio Macias, Prof. Dr. José Maria González Molinillo.

A Andy, Blas, Chon, Ana, Benito, Rodney, Maria Rosário, Maripaz, e tantos outros amigos “espanhóis” por me transmitir a cada dia suas experiências “químicas”. Obrigada a todos pela ajuda, fundamental para complementação deste trabalho.

À FAPESP e à CAPES pela concessão de bolsa de estudo por três e um ano de pesquisa, respectivamente.

E finalmente, a todas as pessoas que fizeram parte desta pesquisa, direta ou indiretamente, e que convivem comigo, o meu ETERNO AGRADECIMENTO.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO GERAL</b> .....	iii
<b>SUMMARY</b> .....	v
<b>1. CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	1
A cultura da soja.....	1
O sistema de Plantio Direto (SPD).....	3
A cobertura vegetal.....	4
A produção de cobertura vegetal.....	5
O gênero <i>Urochloa</i> (syn. <i>Brachiaria</i> ).....	6
O controle químico das coberturas vegetais.....	9
O glyphosate.....	10
Glyphosate <i>versus</i> soja transgênica.....	11
Alelopatia.....	14
Alelopatia e seus principais efeitos.....	16
Alelopatia das coberturas vegetais.....	18
Objetivo Geral.....	19
<b>2. CAPÍTULO 2 - PERÍODOS DE DESSECAÇÃO DE <i>Urochloa ruziziensis</i> E SEU REFLEXO NA PRODUTIVIDADE DA SOJA TRANSGÊNICA</b> .....	
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.. ..	23
Resultados discussão.....	26
Conclusões.....	34
<b>3. CAPÍTULO 3 - ÉPOCA DE DESSECAÇÃO DE <i>Urochloa ruziziensis</i> E EFEITO DA QUANTIDADE E DO POSICIONAMENTO DE SUA PALHA NA NODULAÇÃO E NAS CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS DA SOJA M-SOY 7908 RR</b>	
Resumo.....	36
Introdução.....	37
Objetivo Geral e Específicos .....	41

Material e Métodos..	42
Experimento I.....	42
ExperimentoII.....	44
ExperimentoIII.....	45
Resultados e discussão.....	47
Experimento I.....	47
ExperimentoII.....	50
ExperimentoIII.....	53
Conclusões.....	53
<b>4. CAPÍTULO 4 – SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE <i>Urochloa ruziziensis</i> E SEUS EFEITOS ALELOPÁTICOS.....</b>	
Resumo.....	55
Introdução.....	56
Objetivo Geral e Específicos .....	58
Material e Métodos..	59
Obtenção do material vegetal.....	59
Extração dos compostos da parte aérea de <i>Urochloa ruziziensis</i> .....	61
Fracionamento do extrato bruto metanólico (MeOH).....	62
Isolamento e purificação de compostos do extrato bruto metanólico.....	64
Identificação dos compostos do extrato bruto metanólico.....	64
BIOENSAIOS.....	65
Bioensaio de atividade geral (citotoxicidade).....	65
Bioensaio de fitotoxicidade.....	67
Otimização do bioensaio de fitotoxicidade para plântulas de soja.....	69
Processamento de dados- Tratamento estatístico.....	71
Cálculos dos valores de ID <sub>50</sub> .....	72
Resultados e discussão.....	73
Conclusões.....	103
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>104</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>128</b>

## INTERVALO DE DESSECAÇÃO DE *Urochloa ruziziensis* (R. GERMAN & EVRARD) CRINS E SEU EFEITO ALELOPÁTICO NA CULTURA DA SOJA TRANSGÊNICA

**Resumo Geral** - A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma importante oleaginosa cultivada no Brasil e vem avançando em novas áreas, incluindo as de pastagens. Problemas quanto à queda de produção são relatados por sojicultores quando utilizam pastagens de *Urochloa* dessecada com o herbicida glyphosate e imediatamente semeiam a soja. Objetivou-se, por meio de um conjunto de experimentos, avaliar os efeitos de épocas de dessecação de *U. ruziziensis* (Germain & Evrard) Morr. & Zulaoga, da quantidade da cobertura morta formada e da incorporação ou deposição desta na superfície do solo, sobre a nodulação, desenvolvimento e características produtivas da soja transgênica 'M-SOY 7908 RR' no sistema de plantio direto, assim como a extração, isolamento e identificação de substâncias químicas majoritárias de *U. ruziziensis* com efeito alelopático e a sua possível relação com a precipitação pluvial. Inicialmente, foram conduzidos dois experimentos a campo. Em Colina (SP) foram testadas quatro épocas de dessecação da cobertura vegetal: 30, 20, 10 e 0 dias antes da semeadura (DAS) da soja, enquanto em Jaboticabal (SP) os tratamentos corresponderam a seis épocas de dessecação: 25, 20, 16, 12, 7 e 0 DAS. Nos dois anos agrícolas utilizou-se 1,44 kg e.a. ha<sup>-1</sup> do herbicida glyphosate para a dessecação. A dessecação de *U. ruziziensis* no mesmo dia da semeadura da soja reduziu a altura das plantas, o número de vagens por planta e a produtividade de grãos. A época recomendada para o manejo químico de *U. ruziziensis* com glyphosate está entre 10 e 20 dias antes da semeadura da soja. Na sequência, foram conduzidos três experimentos sob condições semi controladas, na FCAV-UNESP. No primeiro experimento os tratamentos constituíram da incorporação ou deposição na superfície do solo de três quantidades de cobertura vegetal de *U. ruziziensis* dessecada com glyphosate, sendo T1, T2 e T3, respectivamente, a 2,5; 5,0 e 10 t ha<sup>-1</sup> de palha de *U. ruziziensis* na superfície e T4, T5 e T6, 2,5; 5,0 e 10 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente, de *U. ruziziensis* incorporada ao solo a 10 cm de profundidade. No segundo experimento, os tratamentos constaram de três épocas de dessecação da *Urochloa*: 0, 7 e 12 DAS, com uma testemunha sem *Urochloa*. Para o terceiro experimento, os tratamentos foram: T1 dessecação aos 5 DAS; T2 - dessecação aos 5 DAS mas antes de semear a soja retirou-se da parcela a parte aérea da *Urochloa*,

deixando-se as raízes; T3 dessecação aos 10 DAS; T4 dessecação aos 10 DAS mas retirou-se a parte aérea da *Urochloa* e T5 dessecação aos 0 DAS. A deposição da palha de *U. ruziziensis* oriunda da dessecação com glyphosate na superfície do solo favoreceu a nodulação e o crescimento da parte aérea das plantas de soja M-SOY 7908 RR, enquanto a sua incorporação, já a partir de 2, 5 t ha<sup>-1</sup>, causou efeitos deletérios. A dessecação de *U. ruziziensis* dos 0 aos 7 dias antecedendo a semeadura da soja M-SOY 7908 RR foi prejudicial a nodulação e a cultura, devido principalmente a parte aérea da gramínea, inclusive reduzindo sua produtividade. Para a extração, isolamento e identificação de substâncias químicas, plantas de *U. ruziziensis* em início de florescimento foram dessecadas com 1,44 kg ha<sup>-1</sup> de glyphosate e amostradas aos 5 e 10 dias após a dessecação, com uma testemunha sem a aplicação do herbicida. Da parte aérea seca e moída destas plantas foram confeccionados extratos em hexano, diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), nesta sequência de extração. Por meio de bioensaios de citotoxicidade utilizando os dois últimos extratos foi constatado que o MeOH foi mais inibitório que o DCM, independentemente da aplicação do glyphosate. Utilizando técnicas de cromatografia líquida em coluna e em camada delgada de média e alta performance fracionou-se o extrato MeOH, utilizando água e metanol como eluentes. As frações MeOH/água 2:2 (v/v) e MeOH/água 3:1 (v/v) foram as mais inibitórias, novamente independentemente da aplicação do glyphosate, sendo a fração MeOH/água 2:2 (v/v) a mais fitotóxica para a soja. Desta fração foi isolado como composto majoritário a protodioscina, uma saponina esteroidal, que apresentou cito e fitotoxicidade nas plântulas de soja, inclusive quando comparada aos ácidos aconítico e *o*-cumárico, com dose inibitória de 50% (ID<sub>50</sub>) de 97, 160 e 186 µM para massa seca de raízes, comprimento de raiz e de parte aérea, respectivamente. Foram isolados ainda outros dois glicosídeos desta fração. Pelas características das saponinas, plantas de *U. ruziziensis* dessecadas com glyphosate e expostas a chuvas podem apresentar menor teor de protodioscina e, conseqüentemente, menor atividade alelopática.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, *Brachiaria ruziziensis*, alelopatia, glyphosate, protodioscina, dose inibitória de 50% (ID<sub>50</sub>).

## **BURNDOWN INTERVAL OF *Urochloa ruziziensis* ( R. GERMAN & EVRARD) CRINS AND ITS ALLELOPATIC EFFECT ON RR SOYBEAN**

**SUMMARY** – Soybean (*Glycine max*) is an important oleaginous planted in Brazil that has been cropped in new areas, including pastures. Problems of reducing production have been reported by soybean growers when the crop is immediately sown after dissection of pastures of *Urochloa* spp. using glyphosate. Developing a set of experiments, the objectives were to evaluate the effects of the burndown timing of *U. ruziziensis*, the amount of mulch formed, and the incorporation and deposition of mulch onto soil surface on nodulation, development, and yield characteristics of transgenic soybean 'M-SOY 7908 RR cropped in no-tillage system, as well as to extract, isolate, and identify majority chemical substances from *U. ruziziensis* with allelopathic effect and to evaluate the possible relation between the allelopathic effect and the rainfall. Initially, two field trials were carried out. In Colina (SP), four burndown timing were tested, being 30, 20, 10, and 0 days before soybean sowing (DBS) and, in Jaboticabal (SP), burndown timing of 25, 20, 16, 12, 7, and 0 DBS was tested. In both seasons, glyphosate was applied at 1.44 kg a.e. ha<sup>-1</sup> for *U. ruziziensis* dissection. Dissection of *U. ruziziensis* with glyphosate at the same day of soybean sowing reduced plant height, number of pods per plant, and grain yield. Recommended time for *U. ruziziensis* dissection is between 10 and 20 DBS. In the sequence, three experiments in semi-controlled conditions were carried out at FCAV/UNESP. In the first one, treatments constituted of the incorporation into soil or deposition onto soil surface of three mulch amounts of *U. ruziziensis* dissected using glyphosate. Treatments, hereafter expressed by T1, T2, and T3, corresponded to 2.5, 5.0, and 10.0 t ha<sup>-1</sup> of mulch deposited onto soil surface, respectively, while T4, T5, and T6 corresponded to the same amounts of mulch incorporated into 10-cm-depth, respectively. In the second one, treatments were three burndown timing at 0, 7, and 12 DBS, maintaining an *Urochloa*-free check. In the third one, treatments were T1, corresponding to dissection at 5 DBS; T2, dissection at 5 DBS, but the shoot of *Urochloa* was eliminated of the plot before soybean sowing, maintaining



the root system. T3, dissection to 10 DBS; T4, dissection to DBS, eliminating the shoot of *Urochloa*; and T5, dissection at 0 DBS. Deposition of mulch of *Urochloa*, originated from glyphosate dissection, facilitated the nodulation and shoot growth of soybean plants M-SOY 7908 RR, while the incorporation, starting at 2.5 t ha<sup>-1</sup>, caused deleterious effects. Dissection of *U. ruziziensis* from 0 to 7 days before soybean M-SOY 7908 RR sowing damaged to nodulation and to the crop due mainly to the grass shoot, even reducing yield crop. To extract, isolate, and identify chemical substances, plants of *U. ruziziensis* at flowering stage were dissected using glyphosate at 1.44 kg ha<sup>-1</sup>. These plants and a no-treated plant were collected at 5 and 10 days after dissection. Extracts of dry and grinded shoot were obtained by hexane, dichloromethane (DCM), and methanol (MeOH) solvents, in that sequence of extraction. According to cytotoxicity bioassays, MeOH was inhibitorier than DCM, independently of glyphosate application. Using chromatography techniques in column, thin layer, and liquid of medium and high performance, MeOH extract was fractionated using water and methanol as the eluents. MeOH/water 2:2 (v/v) and MeOH/water 3:1 (v/v) fractions were the inhibitoriest, also independently of glyphosate application. MeOH/water 2:2 (v/v) fraction was the most phytotoxic to soybean. Protodioscin, the majority compound, was isolated from that fraction. This substance is a steroidal saponin that showed both cyto- and phytotoxicity in soybean seedlings even comparing with aconitic acid and *o*-cumaric acid, showing inhibitory dosis by 50% (ID<sub>50</sub>) of 97, 160, and 186 µM to root dry mass, root length, and shoot length, respectively. Two glycosides were also isolated from that fraction. According to saponin characteristics, *U. ruziziensis* plants dissected with glyphosate and, in sequence, exposed to rain can show lower protocienin content and, in consequence, lower allelopathic activity.

**Key-words:** *Glycine max*, *Brachiaria ruziziensis*, allelopathy, glyphosate, protodioscin, inhibitory dosis by 50% (ID<sub>50</sub>).

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

No Brasil, o cultivo da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] tem sido uma das principais alternativas para a recuperação e renovação de pastagens degradadas (KICHEL et al., 2000). A rotação da soja com pastagens é uma medida eficaz no controle de plantas daninhas (CORREIA et al., 2006) e nematóides, como reniformes (ASMUS, 2005), do cisto da soja e das galhas (ASMUS; ANDRADE, 2001), além de reduzir a incidência de algumas doenças, como o mofo-branco, fusariose e rizoctoniose (TOLEDO-SOUZA et al., 2008).

Em áreas de recuperação e renovação de pastagens, normalmente, utiliza-se da dessecação da antiga pastagem degradada com o herbicida glyphosate, para, posterior, semeadura da cultura da soja, em sistema de plantio direto. No entanto, há falta de informações científicas a respeito do momento ideal para a semeadura da cultura após a dessecação da cobertura vegetal, para que essa intervenção química não prejudique o estabelecimento, o crescimento e o desenvolvimento das plantas de soja.

Esta pesquisa foi desenvolvida para dirimir lacunas existentes entre o manejo de plantas do gênero *Urochloa* (comum em pastagens degradadas) no sistema plantio direto com a cultura da soja em sucessão. Está alicerçada em relatos de sojicultores, descrevendo sintomas de amarelecimento e redução no crescimento, principalmente, de regiões meristemáticas em plântulas de soja. Além disso, tem sido detectada diminuição da produtividade da cultura quando a semeadura é realizada imediatamente após a dessecação das plantas, utilizando-se do manejo químico com glyphosate.

### **A cultura da soja**

A soja é uma oleaginosa herbácea anual, pertencente à família Fabaceae (SANTOS, 2008), que tem sido utilizada há mais de cinco mil anos como fonte de alimento. Tem como centro de origem o continente asiático, mais precisamente a região correspondente à China antiga, do século XI a.C. Provavelmente, a região Central da

China foi o centro genético primário da soja, com a região Leste (antiga Manchúria) constituindo-se o centro secundário (HYMOWITZ, 1970).

O cultivo comercial da soja teve início no século XX, nos Estados Unidos, com um rápido crescimento mundial desde essa época. Os primeiros materiais genéticos de soja foram introduzidos no Brasil em 1882, no Estado da Bahia, mas não obtendo êxito. Após uma década, foi testado no Estado de São Paulo com pesquisas desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas, encontrando condições ambientais favoráveis para a produção de feno e grãos, principalmente. Todavia, foi no Rio Grande do Sul, em 1914, em que os materiais genéticos testados se desenvolveram melhor, pois as condições climáticas eram semelhantes ao seu local de origem (EMBRAPA, 2005). O avanço significativo da cultura no Brasil ocorreu na década de 1960, com projeção interna e externa do país e desde esta época passou a se destacar no cenário mundial (MIYASAKA; MEDINA, 1981).

A soja é a leguminosa com maior produção mundial de grãos, estando esta em cerca de 242 milhões de toneladas de grãos (2009/2010), sendo os principais países produtores os Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e Índia. É rica em lipídios e em proteína de elevada qualidade. Devido a este valor nutricional, é um dos produtos agrícolas mais utilizados pelo homem, principalmente na forma de óleo vegetal e ração animal. A sua importância cresce frente à perspectiva mundial de grandes aumentos populacionais e em virtude de se constituir em opção de custo relativamente baixo (CARRÃO-PANIZZI, 1988).

Na agricultura brasileira, a soja foi responsável por uma verdadeira revolução, detendo, atualmente, uma importância sócio-econômica elevada. O complexo soja gera, através das exportações, uma receita cambial muito grande ao ano, sendo o maior responsável pela entrada líquida de divisas no país através de produtos básicos exportados. O Brasil possui uma área de 22,4 milhões de hectares cultivados, com produção de soja que supera 62 milhões de toneladas de grãos, sendo a região Centro-Oeste responsável por 46,7% da produção nacional (AGRIANUAL, 2010) e o Estado de Mato Grosso contribuindo com 30%, aproximadamente.

A distribuição espacial da produção nacional da soja encontra-se em todas as regiões do país, concentrando-se nas regiões Centro-Oeste e Sul, com 45 e 38%, respectivamente, da área correspondente à cultura. Juntas essas regiões respondem por 82% da produção nacional de grãos de soja, com os Estados de Mato Grosso e do Paraná responsáveis por 50% da produção nacional. Nos últimos anos, destaca-se a produção da soja transgênica, principalmente, na região Sul do país.

A soja transgênica foi oficialmente liberada para plantio no Brasil no ano de 2005. Segundo a Embrapa (2007), existem vários tipos de sojas transgênicas sendo desenvolvidas. A mais conhecida e plantada comercialmente é uma que recebeu, por meio de técnicas da biotecnologia, um gene de outro organismo capaz de torná-la tolerante ao uso do herbicida glyphosate, denominada de Roundup Ready (RR). Esse gene (AroA) foi extraído de uma bactéria do solo, conhecida por *Agrobacterium* sp., e patentado por uma empresa privada com o nome CP4-EPSPS, a qual codifica uma variante da 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase – EPSPs, especificamente tolerante à inibição pelo glyphosate (PADGETTE et al., 1995). Estruturalmente, é muito parecido com os genes que compõem o genoma de uma planta. Quando inserido no genoma da soja, tornou a planta resistente ao herbicida, pois esta não é afetada devido a ação continuada e sistemática desta enzima alternativa, insensível ao glyphosate. Esta novidade chegou ao campo pela primeira vez nos Estados Unidos, na safra de 1996. No ano seguinte, os agricultores argentinos haviam aderido à novidade.

### **O Sistema de Plantio Direto (SPD)**

Dentre os sistemas de cultivo da cultura da soja no Brasil, o sistema Plantio Direto (SPD) vem crescendo progressivamente nos últimos anos. Em 2003 já era utilizado em 50% da área ocupada com produção de grãos e em 80% da área de produção de soja. O SPD constitui-se na implantação de culturas em solo não revolvido e protegido por cobertura morta, proveniente de restos de culturas, coberturas vegetais semeadas para esse fim, e de plantas daninhas controladas por métodos químicos combinados (FANCELLI; DOURADO, 2000)

No SPD a importância da boa formação de cobertura vegetal na superfície do solo antes da implantação da cultura é requisito imprescindível (ALMEIDA, 1991; DERPSCH et al., 1991; ALVARENGA et al., 2001). Segundo Timossi (2005), a escolha adequada das plantas formadoras da cobertura vegetal e a época ideal de dessecação das mesmas têm sido o grande entrave para se obter êxito em diferentes regiões, pois o clima e o solo apresentam grandes variações.

A inexperiência de produtores iniciantes no SPD, na maioria das vezes, os induz à adoção da semeadura direta sobre a vegetação espontânea, que normalmente apresenta-se com camada de palha má distribuída e em baixas quantidades, comparadas às proporcionadas pelas plantas de cobertura recomendadas. A falta de informações sobre culturas de plantas de cobertura adequadas a cada região, leva ao desestímulo e, às vezes, ao abandono do sistema, por acreditarem ser impossível a formação de cobertura morta em quantidades adequadas (TIMOSSI, 2005).

Para que seja apregoado, o SPD necessita de fontes eficientes de cobertura morta, com longevidade adequada. As forrageiras do gênero *Urochloa* oferecem essa característica, pois fornecem, quando bem manejada, acima de 15 t ha<sup>-1</sup> de biomassa seca, persistindo por mais de seis meses na superfície do solo (COBUCCI, 2001).

### **A cobertura vegetal**

Os resíduos produzidos pelas culturas comerciais geralmente são insuficientes para uma boa cobertura do solo. Portanto, é necessário introduzir plantas capazes de produzir grande quantidade de massa, com rápido desenvolvimento inicial e ciclo curto. É necessário que seus resíduos não sejam decompostos muito rapidamente, de modo que o solo permaneça coberto o maior tempo possível. Estratégias de manejo do solo, rotação de culturas e utilização de espécies de cobertura, que protegem e recuperam a fertilidade do solo, são importantes para o uso dos solos sem causar o declínio de sua produtividade e da rentabilidade ao longo dos anos (ALVARENGA, 1996).

A cobertura morta, deixada pelos restos da cultura anterior por ocasião da colheita ou pela dessecação e/ou rolagem da cobertura vegetal, exerce forte influência

sobre a germinação das plantas daninhas. Estas influências vão ser basicamente de três ordens: física, promovendo a diminuição da amplitude térmica na superfície do solo, a redução da incidência de radiação solar na superfície do solo e o próprio impedimento que a cobertura produz fazendo com que a planta que germine não tenha energia suficiente para passar através da camada de palha; química, com a liberação de aleloquímicos; e biológica, através dos microrganismos, fungos e bactérias que inviabilizam a germinação de algumas plantas daninhas (BUZATTI, 1999).

### **A produção de cobertura vegetal**

Há grande número de artigos sobre o uso de forrageiras anuais dos gêneros *Avena*, *Pennisetum* e *Sorghum*, na entressafra das culturas de verão. Porém, estudos com espécies do gênero *Urochloa* e *Panicum* para esta finalidade são menos comuns, mesmo sendo o cultivo dessas forrageiras para produção de forragem na estação seca uma prática comum entre os produtores de Mato Grosso do Sul e de outros estados. O aumento da disponibilidade de sementes desses dois gêneros, com consequente redução de preços, tem permitido que essas espécies, apesar de perenes, sejam utilizadas como cultivos de cobertura do solo e forrageiras durante a estação seca.

Torres et al. (2008) observaram que *Pennisetum* spp. e *Crotalaria* spp. superaram *U. brizantha* quanto à produção de fitomassa. Com esse mesmo propósito, Menezes et al. (2009) concluíram que *Sorghum bicolor*, *Eleusina indica* e *U. ruziziensis* foram as espécies mais promissoras para produção de fitomassa. Em estudo conduzido por Muraishi et al. (2005), as forrageiras do gênero *Brachiaria* (syn. *Urochloa*) apresentaram crescimento inicial mais lento e foram menos produtivas que espécies anuais, quando avaliadas em curtos intervalos de avaliação (50 dias). Em intervalos mais longos, durante toda a estação seca, Pacheco et al. (2008) observaram que as forrageiras do gênero *Urochloa* foram mais produtivas que plantas de *Pennisetum* sp. e *S. bicolor*. Elas também são mais eficientes na supressão de plantas daninhas e resultam em maior produtividade de grãos de soja, quando utilizadas em sistemas de manejo que as empregam em sucessão à cultura de verão (PACHECO et al., 2009).

As plantas de cobertura, em sistema plantio direto, podem ajudar no controle de plantas daninhas, integrando-se aos demais métodos de controles utilizados (GALLAGHER et al., 2003). São necessários estudos com várias espécies de plantas formadoras de cobertura vegetal a fim de identificar coberturas vegetais com relação carbono/nitrogênio (C/N) alta (superior a 32:1), o que possibilitaria maior duração da cobertura no solo. Além de estudos com espécies recomendadas para implantação deste sistema, há também necessidade de estudos sobre a quantidade e qualidade dos resíduos deixados pela cultura anterior (SILVA et al., 2005).

### **O gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*)**

As espécies do gênero *Urochloa* sp. (Poaceae) são importantes forrageiras de regiões tropicais como a África, Ásia, Austrália e América do Sul. Segundo Ferraz (2003), no Brasil há aproximadamente 95 milhões de hectares cultivados com esse gênero, que corresponde a 80% de toda a área de pastagens. De maneira geral, esse gênero é considerado opção proeminente na formação de cobertura vegetal para o sistema plantio direto, devido à boa produção de matéria seca e por apresentar grandes concentrações de lignina na sua constituição vegetal, o que lhe confere alta relação C/N, e essa característica está relacionada ao tempo de decomposição do material vegetal (NUNES et al., 2006).

O gênero *Urochloa* possui ampla distribuição nos dois hemisférios do globo. No Brasil, está citada a ocorrência de dezesseis espécies, sob a denominação de *Brachiaria* (SENDULSKY, 1978). No Estado de São Paulo, o gênero está representado por cinco espécies, as quais apresentam o lema superior mútico. Em outras espécies de *Urochloa*, o lema superior pode ser aristulado no ápice. Raramente em *Urochloa* a gluma superior apresenta-se abaxial, o que não ocorre nas espécies encontradas em São Paulo. Em estudos sobre as espécies de *Urochloa* para a América do Sul, Morrone e Zuloaga (1992) distinguiram *Brachiaria* de *Urochloa* usando, dentre outros, os seguintes critérios: tipo de articulação da espiguetta (caindo inteira na maturação em *Urochloa*, enquanto em *Brachiaria* o antécio superior cai primeiro); ornamentação do



antécio superior (liso em *Brachiaria* e transversalmente rugoso em *Urochloa*); presença ou ausência de arístula na lema superior (lema mútico em *Brachiaria* e aristulado ou mútico em *Urochloa*).

A espécie *Brachiaria ruzizensis* Germain et Evrard cultivar Kennedy (binômio sinonimizado em *Urochloa ruzizensis*) é originária da África. Está relacionada com a *U. decumbens*, da qual difere por ser de porte maior. Emana um odor peculiar, semelhante ao *Melinis minutifolia*, sendo muito palatável. Não apresenta fator tóxico, não tolera geada e o fogo frequente. Cresce em vários tipos de solos, desde os mais arenosos até os mais argilosos. *Urochloa. decumbens* e *U. ruzizensis* não toleram solos alagadiços, preferindo terrenos com solos bem drenados e com boa fertilidade, demonstrando respostas acentuadas a níveis mais altos de P e K no solo (SERRÃO; SIMÃO NETO, 1971). Com adubação nitrogenada, supera, em produção, as principais gramíneas. Segundo Kissmann (1997), *U. ruzizensis* é uma planta perene, ereta, entouceirada, denso-pubescente, de 0,9 - 1,3 m de altura. Coloração geralmente verde-amarelada, com os racemos das inflorescências alargados ou alados de 3,0 -5,0 cm de largura. A partir da base da planta e dos rizomas formam-se muitos colmos, geniculados na parte inferior; ramificados; enraizando a partir de nós inferiores e contato com o solo. Os rizomas são em forma de tubérculos arredondados com até 15,0 mm de diâmetro. Possuem raízes adventícias a partir de nós inferiores dos colmos. As folhas possuem bainhas mais longas que os entrenós, estriadas, papiloso-pubescentes. Lígulas em forma de cortina densa de cílios. Lâminas lanceoladas, acuminando para o ápice e atenuando para a base, com até 30,0 cm de comprimento por 15,0 mm de largura, com margens denticuladas e ásperas, com nervura mediana evidente, esparsamente papiloso-pilosas. Inflorescências em panículas racemosas, longamente exsertas, com 15,0 – 25,0 cm de comprimento, apresentando de 3 - 6 racemos ascendentes, com 4,0 – 10,0 cm de comprimento, de raque achatada com 3,0 – 5,0 mm de largura, regularmente distanciadas entre si.

Em experimentos conduzidos pela Monsanto (SCALÉA, 2004), *U. ruzizensis* foi selecionada pela análise dos seguintes critérios: a) boa adaptação na região do Cerrado, sendo cultivada há mais de 25 anos como pastagem; b) crescimento prostrado



cobrindo rapidamente o solo, sem formação de touceiras, facilitando o desempenho das semeadouras, mantendo inalterada a velocidade e uniformidade de plantio; c) bom desenvolvimento, tanto em solos de alta quanto de baixa fertilidade; d) alta quantidade de raízes, ocupando todo o solo, promovendo agregação de partículas do solo, melhorando a estrutura física, aeração, retenção de água no solo. As raízes podem atingir profundidade superior a 1,5 m, favorecendo a reciclagem de nutrientes; e) alta atividade fotossintética. Suporta períodos longos de seca e no retorno das chuvas apresenta alta velocidade de crescimento, podendo produzir até 800 kg ha<sup>-1</sup> de matéria seca por semana; f) a germinação pode ocorrer na superfície do solo, não necessitando de adequada incorporação das sementes, podendo ser utilizada em sobressemeadura; g) facilidade de controle nas operações de dessecação, não necessitando de doses elevadas de glyphosate, com morte rápida, facilitando a semeadura; h) boa relação C/N, mantendo a cobertura do solo por um longo período.

Com relação ao uso de *U. ruziziensis* no sistema de Plantio Direto são poucos os trabalhos publicados. Alguns experimentos foram conduzidos pela Monsanto em municípios de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, entre 2003 e 2005, onde se procurou avaliar a eficiência de métodos de incorporação de sementes de milho-ADR 300 e *U. ruziziensis*, comparando três métodos de incorporação (plantio em linha com semeadoras, grade niveladora fechada e correntão), com plantio realizado pós-colheita da soja (março/abril), em áreas previamente dessecadas com Roundup WG para se evitar a matocompetição inicial das plantas daninhas com as coberturas (SCALÉA, 2004). *U. ruziziensis* mostrou-se altamente resistente à seca com alta produção de matéria seca por hectare, produzindo na média dos métodos de incorporação 144% a mais em comparação ao milho.

Visando identificar espécies para a produção de cobertura vegetal, a Embrapa Agropecuária Oeste e Embrapa Algodão, sob a coordenação do pesquisador Fernando Mendes Lamas, com o apoio da Facual e Fundação Centro-Oeste, conduzem projetos, desde 2003, nos municípios de Primavera do Leste e Sorriso, no Mato Grosso. Dos resultados já obtidos, *U. ruziziensis* é a espécie mais adequada. Quando semeada logo após a colheita da soja, a produção de matéria seca foi na ordem de 10 t ha<sup>-1</sup>. Além

disso, a permanência da cobertura vegetal ao longo do tempo foi relevante. Em área onde a palha do milho desapareceu totalmente, ainda havia mais de quatro toneladas de palha por hectare de *Urochloa*. As pesquisas mostraram também que além de melhorar a qualidade física do solo, *Urochloa* auxiliou no controle de nematóides, redução de fungos e permitiu a integração lavoura-pecuária (EMBRAPA, 2005). Nesta linha de pesquisa, Machado et al. (2010) avaliando a produção de palha e forragem por espécies anuais e perenes, inclusive a *U. ruziziensis*, em sucessão à soja concluíram que as forrageiras, *U. ruziziensis* e *U. decumbens*, por manterem-se em crescimento durante toda a estação seca e pela facilidade de dessecação, podem ser mais bem aproveitadas com o propósito de cobertura do solo.

Embora *U. ruziziensis* não seja a espécie mais plantada dentro do gênero, é a única, dentre as cultivadas no Brasil, que é diplóide e exclusivamente sexual (VALLE; SAVIDAN, 1996; SOUZA SOBRINHO, 2005), o que permite a geração de variabilidade e viabiliza à seleção (SOUZA SOBRINHO et al., 2009, 2010).

### **O controle químico das coberturas vegetais**

O método mais utilizado para controlar as plantas daninhas, como também as espécies direcionadas para cobertura do solo, é o químico, isto é, o uso de herbicidas. Suas vantagens são: a economia de mão-de-obra e a rapidez na aplicação.

O eficiente controle químico das plantas de cobertura é essencial para o sucesso no estabelecimento das culturas. Assim, o controle das plantas de cobertura e da infestação por plantas daninhas antes da semeadura permite que a cultura tenha desenvolvimento inicial livre de interferências e impede que ocorram rebrotes e re-infestação na área, facilitando a ação de herbicidas complementares, após a emergência da cultura (ALMEIDA, 1991).

O SPD ocupa hoje cerca de 25 milhões de hectares ou 50% da área plantada com culturas anuais no Brasil. A adoção desta prática pelos agricultores só foi possível graças ao desenvolvimento de herbicidas, dos quais o glyphosate é, sem dúvida, o mais importante e o mais utilizado não só no SPD como também nas culturas perenes. O

SPD trouxe inegáveis benefícios à agricultura e ao ambiente. No entanto, os herbicidas, em especial o glyphosate, podem causar efeitos colaterais indesejáveis nas culturas de interesse econômico.

## O glyphosate

O glyphosate (N-fosfometil glicina) foi originalmente sintetizado em 1964 como potencial quelante industrial e seu uso como herbicida foi descrito apenas em 1971. Devido à limitada solubilidade (1,2% a 25°C) do ácido em água, os sais mais solúveis do ácido são preferidos para as formulações. O termo glyphosate é geralmente utilizado para indicar tanto o ácido como seus sais, pois é reconhecido que eles são biologicamente equivalentes.

O glyphosate é um potente herbicida de pós-emergência, de largo espectro, não-seletivo, capaz de controlar uma grande diversidade de espécies vegetais anuais e perenes, possui baixa toxicidade a peixes aves e mamíferos e, quando no solo, apresenta forte ligação às partículas do solo, em especial aos óxidos de Fe e Al, com rápida biodegradação pelos microrganismos (PLINE-SRNIC, 2006; PRESTON; WAKELIN, 2008).

Uma das mais importantes características do glyphosate, na planta, é sua rápida translocação das folhas tratadas para as raízes, rizomas e meristemas apicais. Esta propriedade sistêmica resulta na destruição total de plantas invasoras perenes, difíceis de matar, tais como rizomas de *Sorghum halepense*, *Agropyron repens*, *Cirsium arvense*, *Cyperus* spp., *Cynodon dactylon*, *Imperata cilindrica* e mesmo *Pueraria lobata* (FRANZ, 1985; GRUYS; SIKORSKI, 1999).

O mecanismo de ação do glyphosate é bastante singular. Atua inibindo a rota do ácido chiquímico e, conseqüentemente, interrompe a síntese de alguns metabólicos secundários de importância vital para as plantas. É o único herbicida capaz de inibir especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs) que catalisa a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, evitando, assim, a

síntese de três aminoácidos essenciais – triptofano, fenilalanina e tirosina (JAWORSKI, 1972; ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004).

A enzima EPSPs das plantas, fungos e da maioria das bactérias isoladas e caracterizadas até hoje são inibidas, em dosagens submicromolar, pelo glyphosate. As bactérias que produzem elevados níveis de EPSPs podem desenvolver-se na presença de concentrações que seriam tóxicas para outros organismos. Assim, a transferência de gene com tolerância ao glyphosate a uma planta suscetível confere, a esta, a tolerância ao glyphosate (GRUYS; SIKORSKI, 1999).

Quando o glyphosate é aplicado sobre as plantas, ocorre inicialmente uma rápida penetração, seguida por uma longa fase de lenta penetração, sendo que a duração dessas fases depende de numerosos fatores, incluindo espécie, idade, condições ambientais e concentração do glyphosate e surfatante. O glyphosate é móvel no floema e é rapidamente translocado para todas as partes da planta, mas tende a se acumular nas regiões meristemáticas. Foi sugerido que as cargas negativas da parede celular e do plasmalema repelem o glyphosate, fortemente aniônico. Essa falta de uma forte ligação pode contribuir para o movimento do glyphosate no apoplasto, ou seja, ele apresenta movimentação tanto simplástica como apoplástica. O herbicida pode penetrar na planta através de outras rotas. Turner e Loader (1974) demonstraram que formulações solubilizadas em óleo permitiram ao glyphosate penetrar pela casca de espécies arbóreas. Raízes de cultivos em solução nutritiva contendo glyphosate absorvem o herbicida, que se transloca pela planta (HADERLIE et al., 1978; GRUYS; SIKORSKI, 1999).

### **Glyphosate *versus* soja transgênica**

Com a legalização, em 2005, no Brasil, para cultivo e comercialização da soja resistente ao glyphosate, várias mudanças ocorreram no sistema de controle das plantas daninhas em decorrência dessa nova biotecnologia: um grande portfólio de produtos ou combinações de produtos utilizados na soja convencional foram substituídos por um único ingrediente ativo, o glyphosate. Todavia, a interferência

negativa do glyphosate sobre microrganismos e também sobre a associação com as plantas vem sendo investigada (KAPS; KUHNS, 1987; EDWARDS, 1989; CHAKRAVARTY; CHATARPAUL, 1990; MOORMAN; DOWLER, 1991; SANTOS et al., 2003, 2004, 2005; MALTY et al. 2006, OLIVEIRA JR et al., 2008).

O glyphosate é um composto de baixa volatilidade e insignificante degradação por meio da fotólise. Porém, a degradação microbiana constitui-se no principal processo de degradação desse produto no solo (AMARANTE JUNIOR; SANTOS, 2002). Esse herbicida, ao entrar em contato com o solo, desde que disponível em solução aquosa e não adsorvido aos colóides, é rapidamente biodegradado por microrganismos, como fungos, bactérias e actinomicetos, com subsequente diminuição de sua persistência no meio ambiente (AHRENS, 1994). No entanto, relatos de toxicidade desse herbicida a microrganismos têm sido verificados na literatura (SANTOS et al., 2003, 2004, 2005).

Quando adsorvido ao solo, o glyphosate não causa intoxicação a espécies vegetais cultivadas após sua aplicação. Contudo, na presença de fungos micorrízicos que realizam a interação fungo-planta, hifas de um mesmo fungo podem promover a união de mais de uma espécie vegetal (KAPS; KUHNS, 1987). Nessa situação, o glyphosate, quando aplicado em uma espécie, poderia afetar o fungo micorrízico e a outra espécie vegetal envolvida. Em experimentos realizados para verificar tal hipótese, Kaps e Kuhns (1987) aplicaram glyphosate com carbono marcado ( $^{14}\text{C}$ ) em solução nutritiva onde cresciam plântulas de *Pinus* spp., transferindo-as, posteriormente, para crescimento junto a espécies de plantas daninhas. Os autores observaram, pela análise radiográfica, moléculas de glyphosate nas espécies daninhas, evidenciando a comunicação radicular entre o *Pinus* spp. e as espécies por meio de micorrizas.

Outro aspecto importante, em se tratando da simbiose na cultura da soja, é a interação rizóbio-raízes da planta quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN). São relatados resultados inconstantes nessa linha de pesquisa, por exemplo, efeitos negativos em linhagens de *Bradyrhizobium japonicum* foram observados por Moorman et al. (1992), que observaram que concentrações de 0,5 e 1,0 mM de glyphosate inibiam o desenvolvimento da linhagem. Estes autores comentavam, já em 1992, que repetidas aplicações de glyphosate nas variedades de soja resistentes ao herbicida

poderiam afetar o rizóbio e que, assim, linhagens de *Rizobium japonicum* resistentes ao glyphosate poderiam ser requeridas. No Brasil, Santos et al. (2003) mostraram que a ação do glyphosate sobre o rizóbio depende das estirpes de *B. japonicum* assim como da formulação comercial de glyphosate empregada.

King et al. (2001) alertaram que altas doses ou repetidas aplicações de glyphosate podem elevar ainda mais essas concentrações, principalmente em drenos metabólicos mais fortes que o sistema radicular, como é o caso dos nódulos radiculares fixadores de nitrogênio. Estes autores mencionam que a FBN é crítica para a obtenção de alta produtividade da soja cultivada em solos sem grande disponibilidade de N.

Em plantio direto sobre *B. decumbens* e *B. brizantha*, a Embrapa (2007) recomenda o período de 30 dias entre a dessecação e a semeadura da soja e uma dosagem que varia de 1,8 a 2,16 kg ha<sup>-1</sup> de glyphosate (equivalente ácido). Timossi (2005) observou que o controle de *B. decumbens* e *B. brizantha* como formadoras de cobertura vegetal foi excelente a partir da dosagem de 2,16 kg ha<sup>-1</sup> de glyphosate, embora não sendo capaz de evitar totalmente a probabilidade de rebrota.

Segundo Almeida (1991), o manejo ou dessecação antecedendo o plantio direto é fundamental para um bom desempenho das lavouras. A eliminação das plantas daninhas antes da semeadura permite que a cultura tenha um desenvolvimento inicial rápido e vigoroso.

Um fator de grande importância para o sucesso do SPD é o intervalo de tempo entre o manejo das coberturas vegetais e a semeadura da cultura. Têm-se verificado que em áreas com grande cobertura vegetal (acima de 50% de cobertura do solo) as culturas que são plantadas em períodos muito curtos após a operação de dessecação apresentaram clorose das folhas no período inicial, com redução no desenvolvimento vegetativo, podendo implicar em queda de produtividade (MELHORANÇA; VIEIRA, 1999). Em contrapartida, períodos longos favorecem o surgimento de possíveis rebrotas ou de um novo fluxo de emergência de plantas daninhas que irão estabelecer-se concomitantemente com a cultura, exigindo um custo maior com o controle complementar.

Peixoto e Souza (2002) verificaram que a produtividade da soja foi diminuída em até 13,9% quando essa foi semeada imediatamente após a dessecação de sorgo. Melhorança e Vieira (1999) verificaram que a época de dessecação de *B. decumbens* afetou o rendimento e o desenvolvimento vegetativo da soja, sendo que a dessecação realizada 18 dias antes da semeadura propiciou rendimento 17 e 32% superiores às dessecações realizadas aos 7<sup>o</sup> e 1<sup>o</sup> dias antes da semeadura, respectivamente.

A garantia de bons resultados com a implantação da cultura no SPD depende de se realizar um bom manejo das culturas vegetais, combinado com um eficiente controle químico das plantas daninhas (TIMOSSI, 2005). Entretanto, muitas dúvidas sobre as interações entre coberturas vegetais e herbicidas no controle de plantas daninhas ainda precisam ser esclarecidas para que o agricultor possa usufruir de todos os benefícios do sistema (CORREIA, 2006).

### **Alelopatia**

Os vegetais liberam no ambiente uma grande variedade de metabólitos primários e secundários a partir de folhas, raízes e serrapilheira em decomposição. Estudos realizados sobre os efeitos desses compostos em plantas próximas constituem o campo da alelopatia (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Muitas plantas produzem metabólitos, aparentemente sem uma função fisiológica equivalente à dos metabólicos primários, os quais se acumulam nos diversos órgãos das plantas, mas com uma função ecológica importantíssima. Desta forma, muitas espécies interferem no crescimento e desenvolvimento de outras por meio da produção e liberação de compostos químicos com propriedades atrativas, estimulatórias ou inibitórias. Estes são denominados aleloquímicos ou bioativos, e a esse fenômeno alelopatia (RICE, 1974).

O efeito químico da cobertura vegetal sobre o crescimento e/ou desenvolvimento das plantas daninhas também pode ser explicado pelo fenômeno da alelopatia, que, segundo a definição da Sociedade Internacional de Alelopatia de 1996, significa qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos pelas plantas e



microrganismos que influencia o crescimento e o desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos. Deve-se considerar, também, que a esse efeito inibitório da cobertura morta pode se associar o efeito anterior da cobertura do solo por plantas vivas, que podem ter exercido um efeito supressor ou sufocante sobre várias espécies de plantas daninhas (ALVES et al., 2004).

A alelopatia tem sido reconhecida como um importante mecanismo ecológico que influencia a dominância vegetal, a sucessão, a formação de comunidades vegetais e de vegetação clímax, bem como a produtividade e manejo de culturas. Substâncias alelopáticas são encontradas distribuídas em concentrações variadas em diferentes partes da planta e durante seu ciclo de vida (periodicidade). Quando essas substâncias são liberadas em quantidades suficientes causam inibição ou estimulação (dependendo da concentração) da germinação, crescimento e/ou desenvolvimento de plantas já estabelecidas e, ainda, no desenvolvimento de microrganismos (CARVALHO, 1993).

De acordo com Santos et al. (2001), a expressão “ação alelopática” refere-se à especificidade da composição bioquímica e das características biológicas pertinentes às espécies doadoras e receptoras que promovem a ocorrência da interação alelopática.

A importância da alelopatia em ecossistemas naturais ainda é questionada por vários autores. É fácil mostrar que os extratos ou os compostos purificados de uma planta possam inibir o crescimento de outra planta em experimentos de laboratório, mas não tem sido fácil demonstrar que esses compostos estejam presentes no solo em quantidade suficiente para alterar o desenvolvimento de um vegetal. Além disso, as substâncias orgânicas presentes no solo, muitas vezes, ligam-se a partículas do solo e podem ser rapidamente degradadas por microrganismos (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Segundo Rezende et al. (2003), a alelopatia distingue-se de competição, pois essa envolve a redução ou retirada de algum fator do ambiente necessário à outra planta no mesmo ecossistema, tal como a água, luz e nutrientes. Taiz e Zeiger (2010) explicam que uma planta pode reduzir o crescimento das plantas vizinhas pela liberação de aleloquímicos no solo, isso pode ter como consequência a maior chance de acesso à luz, à água e aos nutrientes e, portanto, propiciar sua maior adaptação evolutiva.



O conteúdo dos aleloquímicos em uma planta pode ser influenciado por vários fatores, como sazonalidade, ritmo circadiano, fase de desenvolvimento da planta e as condições ambientais (EINHELLIG, 1995). Além disso, alguns desses fatores apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo secundário (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

### **Alelopatia e seus principais efeitos**

Desde a antiguidade, sabe-se que algumas espécies vegetais podem prejudicar o crescimento de outras que estão na proximidade. Durante muito tempo esse fato foi considerado inexplicável. Taiz e Zeiger (2010) ressaltam que os estudos sobre os compostos secundários produzidos pelos vegetais foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, interessados nessas substâncias, pela sua importância como drogas medicinais, venenos, aromatizantes e materiais industriais. Os autores explicam que mais recentemente foi sugerido que muitos produtos do metabolismo secundário têm funções ecológicas importantes nos vegetais, e protegem as plantas contra os herbívoros e contra a infecção por microrganismos patogênicos. Eles estimulam animais polinizadores e dispersores de sementes, bem como agentes na competição planta-planta.

De acordo com Miller (1996), os metabólitos de plantas e seus produtos são importantes em todos os agroecossistemas. O autor resalta os conceitos de autotoxicidade e heterotoxicidade que são tipos de atuações alelopáticas. A autotoxicidade ocorre quando a planta produz substâncias tóxicas, que inibem a germinação e o crescimento intraespecífico. A heterotoxicidade ocorre quando substâncias fitotóxicas são liberadas pela lixiviação e exsudação das raízes e decomposição de resíduos de algum tipo de planta sobre a germinação de sementes e o crescimento de outra espécie (WHITTAKER; FEENEY, 1971).

Quimicamente, a cobertura vegetal atua com seu efeito alelopático, pois libera substâncias no meio que diminuem a germinação e o desenvolvimento de plantas daninhas. *Crotalaria juncea* é uma leguminosa anual que, segundo Calegari et al.

(1993) tem efeito alelopático e/ou supressor nas plantas daninhas, sendo utilizada muitas vezes como cobertura morta para o plantio da soja.

De acordo com Olibone et al. (2006), as substâncias químicas liberadas pelos resíduos vegetais deixados sobre a superfície do solo, como o que ocorre no SPD, têm comportamento diferenciado em relação ao que ocorre pelo método de incorporação. Na incorporação, essas substâncias ficam diluídas no volume do solo correspondente à profundidade em que foram enterradas; já na semeadura direta elas se concentram na camada superficial do solo. Dessa forma, como a intensidade dos efeitos alelopáticos depende da concentração dos aleloquímicos, a sua ação é mais pronunciada na semeadura direta.

Na maioria das vezes, ocorre maior influência das substâncias alelopáticas nos solos arenosos, em comparação aos solos ricos em matéria orgânica. Isso é devido à inativação e destruição das toxinas presentes nestes compostos ocorrerem de forma lenta em solos pobres. Com base nesses aspectos, é de se esperar maior influência da alelopatia em solos arenosos do que em solos ricos em microrganismos (BARCIK, 1999).

É importante lembrar que os efeitos benéficos de uma planta sobre outra não devem ser desvinculados do conceito de alelopatia, uma vez que um dado composto químico pode ter efeito inibitório ou estimulante, dependendo da concentração do mesmo no ambiente.

São poucas as informações sobre como as substâncias alelopáticas atuam nas plantas. A grande dificuldade que se apresenta é que essas substâncias afetam mais de uma função e provoca efeitos colaterais difíceis de distinguir-se dos principais. Almeida (1991) menciona que as substâncias alelopáticas podem provocar redução da germinação, diminuição do vigor vegetativo ou causar a morte das plântulas, amarelecimento ou clorose das folhas, redução do perfilhamento e atrofiamento ou deformação das raízes.

De acordo com Miró et al. (1998), a alelopatia tem atraído grande interesse devido às suas aplicações potenciais na agricultura. As diminuições de produtividade causadas por plantas daninhas ou por resíduos de culturas anteriores podem ser

resultado dos efeitos alelopáticos. Uma perspectiva interessante é o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para serem alelopáticas às plantas daninhas.

### **Alelopatia das coberturas vegetais**

A liberação de aleloquímicos das coberturas vegetais pode influenciar na emergência e crescimento de plantas daninhas remanescentes. Algumas espécies utilizadas para este fim têm demonstrado potencial alelopático, melhorando o manejo de plantas daninhas em áreas nas quais são realizados controles químicos e até dispensando a utilização de herbicidas, de acordo com a comunidade infestante da área. Neste sistema, a decomposição da cobertura vegetal resulta na produção ou liberação de compostos fitotóxicos que são prejudiciais ao crescimento de plantas daninhas. Como exemplo, pode-se citar a decomposição de resíduos de centeio associados ao SPD, que é um potencial recurso da alelopatia capaz de reduzir a biomassa das plantas daninhas (BARNES; PUTNAM, 1983).

### **Pesquisas alelopáticas de *Urochloa* em soja**

O gênero *Urochloa* possui atividade alelopática inibitória comprovada na germinação de sementes e no desenvolvimento de plantas de diferentes espécies (SOUZA FILHO et al., 1997a, MARTINS et al. 2006, SOUZA et al. 2006). SOUZA FILHO et al. (1997b) comprovaram atividade alelopática, tanto nas sementes, como na parte aérea, sendo a parte aérea a principal fonte de substâncias ativas.

Nunes et al. (2005) estudaram a interação entre a dessecação de *B. decumbens* aos 0, 7 e 14 dias antes da semeadura e a germinação de soja, não encontrando influência significativa na germinação. Pelos resultados desses autores, pode-se afirmar que qualquer influência da cobertura vegetal de *B. decumbens* na cultura da soja que possa ser observada ocorrerá após a germinação.

A interferência da *Urochloa* no crescimento e desenvolvimento da cultura da soja, quando utilizado o sistema “aplique e plante”, prática de dessecação da cobertura e

imediate semeadura da soja, não está bem elucidada. Alguns autores justificam que, talvez, seja efeito fitotóxico, direto ou indireto, do glyphosate (SANTOS et al, 2005, OLIVEIRA JR et al., 2008), outros que esteja relacionado com efeito alelopático da *Urochloa* na soja (SILVA et al., 2006; SANTOS et al., 2007; NUNES et al., 2009).

Na literatura encontram-se alguns trabalhos relacionados com a incorporação de *Urochloa* e a ocorrência de efeito alelopático nas culturas. Entretanto, quanto ao SPD com o uso de cobertura vegetal proveniente de *U. ruziziensis* há poucas informações publicadas.

### **Hipótese de trabalho**

Verificar possível efeito deletério de *Urochloa. ruziziensis* na cultura da soja RR através da interferência da massa seca de *U. ruziziensis* e as substâncias do metabolismo secundário nela contidas sobre o crescimento e a produtividade de soja RR no sistema de plantio direto.

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar a relação entre a época de dessecação de *U. ruziziensis* e o desenvolvimento e produtividade da soja transgênica no SPD;
- Investigar a atividade citotóxica dos extratos brutos extraídos da *U. ruziziensis* com e sem aplicação do herbicida glyphosate;
- Adequar técnicas de fracionamento que permitam isolar compostos bioativos (aleloquímicos) da parte aérea de *U. ruziziensis*;
- Isolar e identificar os compostos alelopáticos majoritários e/ou bioativos da parte aérea de *U. ruziziensis*;
- Investigar a atividade citotóxica e fitotóxica do composto majoritário, extraído da *U. ruziziensis*, em plântulas de soja.

## **CAPÍTULO 2 - PERÍODOS DE DESSECAÇÃO DE *Urochloa ruzizensis* E SEU REFLEXO NA PRODUTIVIDADE DA SOJA TRANSGÊNICA**

**RESUMO** - Com o objetivo de avaliar os efeitos de épocas de dessecação de *Urochloa ruzizensis* na implantação e na produtividade da soja transgênica no sistema de Plantio Direto, foram conduzidos dois experimentos a campo, nos municípios de Colina, SP, no ano agrícola de 2007/08, e Jaboticabal, SP, em 2009/10. Em Colina, utilizou-se uma área de pastagem de *U. ruzizensis*, conduzida há sete anos. Nesse local foram testadas quatro épocas de dessecação da cobertura vegetal: 30, 20, 10 e 0 dias antes da semeadura da soja. No experimento de Jaboticabal, a área utilizada tinha histórico de pastagem com *U. ruzizensis*, que no ano agrícola 2008/09 foi cultivada com milho. Após a colheita do milho ocorreu reinfestação natural de *U. ruzizensis* na área, correspondendo a mais de 80% de cobertura vegetal. Nesse experimento, os tratamentos corresponderam a seis épocas de dessecação: 25, 20, 16, 12, 7 e 0 dias após a aplicação. Nos dois experimentos utilizou-se 1,44 kg e.a. ha<sup>-1</sup> do herbicida glyphosate e a cultivar de soja M-SOY 7908 RR. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. Foram avaliados o estande da cultura aos 20 dias após a semeadura e duas avaliações de acompanhamento do crescimento quanto à altura, área foliar, massa seca de folhas e caules aos 40 e 50 dias. Na pré-colheita, altura de plantas, altura de inserção da primeira vagem, número de vagens por planta e rendimento de grãos (produtividade estimada em kg ha<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F), com as médias sendo comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e a produtividade de grãos à análise de regressão. A dessecação de *U. ruzizensis* no mesmo dia da semeadura da soja reduziu a altura das plantas, o número de vagens por planta e a produtividade de grãos. A época recomendada para o manejo químico de *U. ruzizensis* com glyphosate está entre 10 e 20 dias antes da semeadura da soja. Pôde-se concluir que a época de dessecação de *U. ruzizensis* afetou a produtividade da cultura.

**Palavras-chave:** *Brachiaria ruzizensis*, *Glycine max*, cobertura vegetal, alelopatia, glyphosate.

## Introdução

As espécies do gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) são importantes forrageiras de regiões tropicais como a África, Ásia, Austrália e América do Sul. Segundo Ferraz (2003), no Brasil há aproximadamente 95 milhões de hectares cultivados com espécies desse gênero.

O gênero *Urochloa*, de maneira geral, vem sendo considerado a principal opção na formação de palhada para o sistema plantio direto, devido à alta relação C/N em sua composição, relacionada com grandes concentrações de lignina, o que prolonga seu período de decomposição e pela boa produção de matéria seca. A palhada contribui na formação de uma camada espessa e uniforme de cobertura morta sobre o solo constituindo em uma barreira física, auxiliando no controle de plantas infestantes.

As espécies forrageiras *U. ruziziensis* e *U. decumbens*, por se manterem em crescimento durante toda a estação seca e pela facilidade de dessecação, podem ser melhor aproveitadas com o propósito de cobertura do solo (MACHADO; ASSIS, 2010). Entretanto, Nunes et al. (2006) ressaltam que para a utilização da palhada, com função de cobertura do solo, são necessárias informações que esclareçam sobre o período ideal entre a dessecação e a semeadura da cultura, para que esta não influencie negativamente a cultura em sucessão.

Na dessecação das coberturas vegetais, um dos herbicidas mais utilizados é o glyphosate. Diversas doses de glyphosate têm sido testadas para a obtenção de cobertura morta de diferentes plantas de cobertura. Em plantio direto sobre *B. decumbens* e *B. brizantha*, a Embrapa (2007) recomenda o período de 30 dias entre a dessecação de *Brachiaria* e a semeadura da soja, utilizando doses de 1,8 a 2,16 kg e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate.

Existem vários relatos de agricultores sobre sintomas de amarelecimento e redução no crescimento das plantas de soja, com conseqüente diminuição na produtividade de grãos, quando utilizam áreas provenientes de pastagem com *Urochloa* em sistema de plantio direto. E esse efeito é mais perceptível quando a semeadura da soja é realizada imediatamente após a dessecação da cobertura.

Uma hipótese para os sintomas ocorridos na cultura da soja pode ser devido ao processo de degradação do glyphosate dentro da planta, que resulta na formação do ácido aminometilfosfônico (AMPA), conhecida fitotoxina (DUKE et al. (2003); REDDY et al. (2004)). Segundo Reddy et al. (2003), a formação de AMPA na planta depende da taxa de glyphosate aplicada, do material genético e das condições ambientais.

Melhorança e Vieira (1999) verificaram que a época de dessecação de *B. decumbens* afetou o rendimento e o desenvolvimento vegetativo da soja, sendo que a dessecação realizada 18 dias antes da semeadura propiciou rendimentos 17 e 32% superiores ao das dessecações realizadas aos 7 e 1 dia antes da semeadura, respectivamente.

Os sintomas observados nas plantas de soja provavelmente, também, estão relacionados com a quantidade da cobertura vegetal depositada sobre a superfície do solo, que pode alterar a dinâmica do carbono e do nitrogênio do solo, impondo uma ação física e também química, como o efeito alelopático da constituição química da cobertura vegetal. As substâncias alelopáticas liberadas por lixiviação, volatilização ou degradação do material orgânico, podem ser transferidas entre as plantas doadoras e receptoras por meio da absorção pela epiderme foliar ou pela raiz (SOUZA FILHO; ALVES, 2002). A decomposição da cobertura vegetal resulta na produção e/ou liberação de compostos alelopáticos que afetam o crescimento de plantas daninhas (BARNES; PUTNAM, 1983), mas que também podem prejudicar a cultura (CHOU; PATRICK, 1976).

Existem vários fatores que influenciam no conteúdo dos aleloquímicos em uma planta, como a sazonalidade, o ritmo circadiano e a fase de desenvolvimento da planta, por exemplo. Além disso, alguns desses fatores apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo secundário (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Gramíneas forrageiras do gênero *Urochloa* possuem atividade alelopática inibitória comprovada sobre a germinação de sementes e no desenvolvimento de plantas de diferentes espécies (SOUZA FILHO et al., 1997a; MARTINS et al., 2006; SOUZA et al., 2006). Estudos desenvolvidos com esse gênero comprovaram atividade

alelopática tanto nas sementes como na parte aérea, sendo a parte aérea a principal fonte de substâncias químicas com atividade potencialmente alelopática (SOUZA FILHO et al., 1997b).

De acordo com Olibone et al. (2006), as substâncias químicas liberadas pelos resíduos vegetais deixados sobre a superfície do solo, como o que ocorre no sistema de plantio direto, têm comportamento diferenciado em relação ao que ocorre pelo método de incorporação. Na incorporação, essas substâncias ficam diluídas no volume do solo correspondente à profundidade em que foram enterradas, enquanto no plantio direto elas se conectam na camada superficial. Desta forma, como a intensidade dos efeitos alelopáticos depende da concentração dos aleloquímicos, a sua ação é mais pronunciada no plantio direto.

Na literatura há vários trabalhos relacionados com a incorporação de braquiária e a ocorrência de efeito alelopático nas culturas. Entretanto, quanto ao sistema de plantio direto com o uso de uma cobertura vegetal proveniente de *U. ruziziensis* há poucas informações publicadas.

### **Objetivos:**

#### **Geral:**

Verificar o efeito do período de dessecação de *Urochloa ruziziensis* sobre soja transgênica cv. M-SOY 7908 RR em plantio direto.

#### **Específicos:**

- Avaliar a campo, em dois locais, os efeitos dos períodos de dessecação da *U. ruziziensis* na implantação, no desenvolvimento e na produtividade de grãos de soja transgênica M-SOY 7908 RR.

### **Material e Métodos**

Foram conduzidos dois experimentos a campo, em Colina, SP, no ano agrícola 2007/08 e em Jaboticabal, SP, em 2009/10. Em Colina, foi realizado em área de



pastagem, implantada há sete anos com *U. ruziziensis*. Em Jaboticabal, utilizou-se uma área com histórico de pastagem de *U. ruziziensis*, que na safra anterior, de verão, foi cultivada com milho. Após a colheita do milho ocorreu reinfestação de *U. ruziziensis*, correspondendo a 80 % de cobertura vegetal.

A amostragem da cobertura vegetal, para os dois experimentos, foi realizada na pré-dessecação inicial, utilizando um quadro vazado de 1,0 x 1,0 m lançado quatro vezes aleatoriamente nas áreas, para estimar a quantidade de cobertura morta existente (em kg ha<sup>-1</sup>). Os materiais contidos nos quadros foram cortados rente ao solo, acondicionados em saco de papel e levado para secagem em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 70°C até massa seca constante para determinação da matéria seca. Em Colina, *U. ruziziensis* representava 100 % da cobertura vegetal do solo, enquanto em Jaboticabal correspondeu a mais de 80 %, com ocorrência de algumas plântulas de *Indigofera hirsuta* (anileira), *Conyza canadensis* (buva), *Phyllanthus tenellus* (quebra-pedra) e outras, que não foram coletadas na amostragem pois estavam muito pequenas, com uma a duas folhas. No momento da coleta, em Colina, as plantas de *U. ruziziensis* encontrava-se, em média, com 0,6 a 0,7 m de altura (início do florescimento) e em Jaboticabal, apresentavam-se menores, de 0,3 a 0,4 m.

Em Colina foram testadas quatro épocas de dessecação antecedendo a semeadura da soja: aos 30, 20, 10 e 0 dias. Para o experimento em Jaboticabal, os tratamentos corresponderam a seis períodos de dessecação antecedendo a semeadura da soja: 25, 20, 16, 12, 7 e 0 dias.

Nos dois experimentos utilizou-se 1,440 kg e.a. ha<sup>-1</sup> do herbicida glyphosate para a dessecação, empregando-se um pulverizador costal de precisão, munido de barra com seis pontas de jato plano (TT110.02), espaçados de 0,5 m, com consumo de calda equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup> à pressão constante de 2,24 kgf cm<sup>-2</sup>.

Os dois experimentos foram instalados sobre um Latossolo Vermelho eutrófico típico de textura argilosa. Com base em análise de solo e na necessidade nutricional da cultura, realizou-se adubação, que constituiu de aplicação de 270 kg ha<sup>-1</sup> da formulação 02-20-20 (N-P-K) no sulco de semeadura.

A cultivar de soja utilizada foi a M-SOY 7908 RR, semeada em uma única época, nos respectivos anos. As sementes foram previamente tratadas com fungicida (thiabendazole, na dosagem de 150 g p.c./100kg de sementes e thiram, na dosagem de

280 ml p.c./100kg de sementes). Em seguida, as sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*, na dosagem de 200 g de produto comercial (Urelec) por 100 kg de sementes. A semeadura foi realizada mecanicamente, com espaçamento entrelinhas de 0,45 m, a uma profundidade de 5 cm. Foram distribuídas 23 sementes por metro.

No decorrer do período experimental foram tomadas todas as medidas preventivas e curativas visando a boa sanidade da cultura. Para o manejo das plantas daninhas, foi realizada uma única aplicação de glyphosate no estágio fenológico V2 (FEHR, 1971) da cultura da soja, na dose de 1.080 kg e.a. ha<sup>-1</sup>.

O delineamento experimental utilizado, nos dois experimentos, foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. As parcelas experimentais tinham dimensões de 10 m x 6 m, tomando-se como área útil cinco linhas centrais, exceto um metro de cada extremidade, totalizando 18 m<sup>2</sup>.

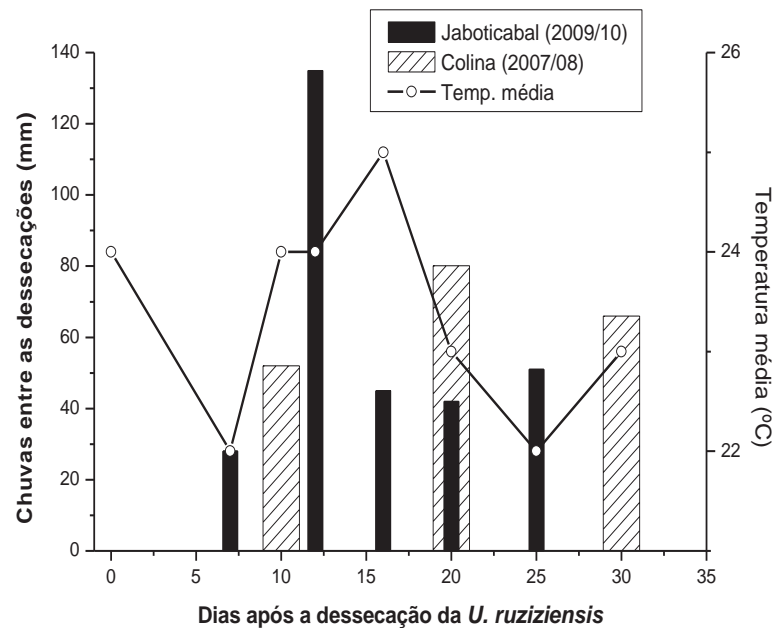
Aos 20 dias após a semeadura (DAS) da soja foi determinado o estande inicial, contando-se as plantas existentes dentro da área útil de cada parcela.

Para Jaboticabal aos 40 e 50 dias da semeadura, foram realizadas duas avaliações em 0,4 cm da linha de semeadura para acompanhamento do crescimento e desenvolvimento das plantas de soja. Na ocasião a soja encontrava-se no estágio fenológico V6 e R1 aos 40 e 50 dias, respectivamente. Fez-se medição da altura e da área foliar e pesagem da massa seca de folhas e de caules.

Por ocasião da colheita (120 DAS), foram determinadas a produtividade e massa seca de 100 grãos das plantas existentes na área útil de cada parcela. Determinou-se também, nas plantas de soja presentes em 0,5 m da linha semeada, a altura das plantas, a altura de inserção da primeira vagem e número de vagens por planta. Para expressão de produtividade e massa seca de 100 grãos, a umidade dos grãos foi corrigida para 13%.

Foram coletados os dados de precipitação pluvial e temperatura média na Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, e na Estação Climatológica de Colina, ambos acumulados durante os períodos em que se realizou a dessecação da cobertura vegetal de *U. ruziziensis*, antecedendo a semeadura da soja (Figura 1).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, com as médias sendo comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e com os dados de produtividade de grãos, de Jaboticabal, foi realizada análise de regressão.



**Figura 1.** Índices pluviométricos e temperatura média na área de Colina (2007/08) e Jaboticabal (2009/10), durante os períodos em que se realizou a dessecação da *U. ruziziensis* com glyphosate, antecedendo a semeadura da soja (M-SOY 7908 RR). Jaboticabal, 2011.

## Resultados e Discussão

Em Colina, após a dessecação com glyphosate, houve a formação de uma camada de *U. ruziziensis* morta sobre o solo de, aproximadamente, 16 cm de espessura, correspondendo a 10 t ha<sup>-1</sup> de massa seca, com o solo encontrando-se totalmente recoberto pela cobertura vegetal. Em Jaboticabal, a cobertura de *U. ruziziensis* dessecada correspondeu a 6,0 t ha<sup>-1</sup>. Essa menor quantidade de massa seca em Jaboticabal foi consequência do menor desenvolvimento da *Urochloa* e também ao não recobrimento total do solo, cobrindo somente 80 %. Mesmo com essa diferença na quantidade, e espessura da cobertura morta sobre o solo formada nos dois

experimentos, não se constatou efeito significativo destas sobre o estande da soja aos 20 dias após a semeadura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Estande da soja (plântulas m<sup>-1</sup>) aos 20 dias após a semeadura da soja em Colina e Jaboticabal, em função dos períodos de dessecação da *U. ruziziensis*.

Local	DAA <sup>1</sup>	Estande	Local	DAA	Estande
				25	14,90 A
	30	16,50 A		20	15,80 A
Colina	20	16,10 A	Jaboticabal	16	15,60 A
	10	15,78 A		12	14,7 A
	0	15,72 A		7	15,10 A
				0	15,3 A
F bloco		2,29 NS			1,08 NS
Ftrat.		3,39 NS			1,29 NS
DMS		0,816			2,67
CV(%)		2,71			5,12

DAA<sup>1</sup> = Dias após a aplicação, Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS – não significativo.

Existem vários fatores, principalmente as condições edafoclimáticas e os diferentes intervalos de tempo entre a semeadura da cobertura vegetal e o seu manejo, que são responsáveis pelas quantidades de massa seca formadas. Nunes et al. (2009) encontraram 8,6 t ha<sup>-1</sup> de massa seca em vegetação nativa de *B. decumbens*, que após o manejo químico representou uma camada de palha com 15 cm. Nunes et al. (2006), observaram 11 t ha<sup>-1</sup> de massa seca de *B. decumbens*, também em pastagem naturais. Timossi et al. (2006) trabalhando com formação de cobertura morta para o sistema plantio direto, relataram a obtenção de 7,4 t ha<sup>-1</sup> de massa seca dessa espécie.

Na avaliação de acompanhamento do crescimento e desenvolvimento da cultura da soja em Jaboticabal, aos 40 dias após a semeadura da soja (Tabela 2), detectou-se que ocorreu redução, no tratamento 0 DAD, na área foliar, massa seca de folhas e caule, em média, de 42 %, 37,5 % e 32,5 %, respectivamente, diferindo significamente dos demais tratamentos. O tratamento 7 DAD , mesmo não diferindo dos outros

tratamentos, 12 DAD, 16 DAD, 20 DAD e 25 DAD, foi perceptível, em termos de média, uma redução em todos os parâmetros analisados.

**Tabela 2.** Média da altura de plantas de soja, área foliar, massa seca de folhas e de caule da avaliação das características de crescimento e desenvolvimento, estágio V6, realizada aos 40 dias após a semeadura da soja.

Tratamentos	Altura de plantas (cm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Massa seca de folhas (g)	Massa seca de caule (g)
25 DAD*	32,61A	4421 A	16,20 A	8,44 A
20 DAD	33,14A	4778 A	17,85 A	8,62 A
16 DAD	33,10A	4737 A	17,70 A	8,81 A
12 DAD	33,43A	4274 A	16,31 A	8,19 AB
07 DAD	29,23A	3329 AB	12,53 AB	6,51 AB
00 DAD	30,13A	2627 B	10,05 B	5,60 B
Trat. Sem Braç.	33,32A	4494 A	16,13 A	8,05 AB
F blocos	1,58 NS	0,14 NS	0,15 NS	0,57 NS
F Trat.	1,21 NS	5,29**	5,29**	4,71**
DMS	6,790	1635	5,86	2,61
CV (%)	9,30	17,10	16,45	14,45

Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS – não significativo, \*\*significativo a 1% e \* 5% de probabilidade.

DAD\* - Dias após a dessecação

Na avaliação, aos 50 dias após a semeadura da soja (Tabela 3), no tratamento zero (00) DAD, ocorreu redução significativa, próxima a 40%, nos parâmetros avaliados de área foliar, massa seca de folhas e caule. Esses resultados encontrados corroboram os de Oliveira Júnior (2006), Santos et al. (2007) e Nunes et al. (2009) em que observaram que a dessecação realizada na data da semeadura – sistema conhecido como “aplique e plante” – ou dez dias antes prejudicou o desenvolvimento da soja, resultando em queda de produtividade, quando comparado ao manejo antecipado de, aproximadamente, 20 dias para a semeadura. Nesta avaliação também foi detectada, para o tratamento 7 DAD, redução significativa quanto à área foliar, massa seca de folhas e caule, sendo assim confirmada as reduções, que na avaliação anterior, aos 40 dias após a semeadura da soja, expressavam-se, apenas como tendência.

**Tabela 3.** Média da altura de plantas de soja, área foliar, massa seca de folhas e de caule da avaliação das características de crescimento e desenvolvimento no estágio fenológico R1, realizada aos 50 dias após a semeadura da soja. Jaboticabal, 2010.

Tratamentos	Altura de plantas (cm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Massa seca de folhas (g)	Massa seca de caule (g)
25 DAD	51,50 ABC	8.223 AB	30,17 AB	18,06 AB
20 DAD	57,47 A	9.782 A	35,94 A	21,98 A
16 DAD	55,29 AB	9.273 A	34,66 A	21,31 AB
12 DAD	54,61 AB	8.373 AB	32,49 AB	20,25 AB
07 DAD	50,14 BC	7.206 B	27,10 B	17,29 B
00 DAD	46,14 C	5.199 C	18,96 C	12,43 C
F blocos	2,65 NS	1,05 NS	2,22 NS	6,27**
F Trat.	7,66**	14,77**	13,99**	14,37**
DMS	6,81	1.861	7,33	4,22
CV (%)	5,64	9,81	10,31	9,51

Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS – não significativo, \*\*significativo a 1% de probabilidade.

DAD - Dias após a dessecação.

No experimento em Colina, verificou-se, na ocasião da colheita, o efeito da época de dessecação na altura de plantas (Tabela 4), sendo que ocorreu redução significativa de 10% quando adotado o manejo aos zero dias após a aplicação - DAA (aplique e plante) em relação aos demais manejos. Mesmo efeito foi observado para o experimento em Jaboticabal, mas com redução média de 7% (Tabela 5). A redução mais acentuada na altura de plantas de soja em Colina deve-se, provavelmente, ao efeito da quantidade de cobertura morta disposta sobre o solo, que foi 40% maior quando comparada com a de Jaboticabal. A esse fato infere-se também uma possível maior concentração de aleloquímicos solúveis em água, presentes na solução do solo, provenientes da forrageira, uma vez que a concentração de aleloquímicos é dependente da quantidade de resíduos vegetais no solo (OLIBONE et al., 2006), ressaltando que existem vários fatores que também influenciam na concentração de aleloquímicos nas plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O número de vagens por planta, em Colina, foi reduzido, em média, 20% com a dessecação de *U. ruziziensis* aos zero DAA (Tabela 4). Em Jaboticabal, essa

característica foi reduzida significativamente aos 0, DAA (Tabela 5). A redução ocorrida no número de vagens aos 0 e 7 DAA deve-se, possivelmente, como ocorreu para a altura de plantas, à concentração de aleloquímicos, que estavam disponíveis na solução do solo.

Em Colina, a produtividade da soja ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) foi reduzida, em média, em 30% com a dessecação da *U. ruzizensis* realizada aos zero DAA, que correspondeu à aplicação feita no dia da semeadura da soja, quando comparada com as outras épocas (Tabela 4), enquanto em Jaboticabal, a produtividade da soja foi reduzida em média, em 8% com a dessecação realizada aos 0, 7 e 25 DAA (Tabela 5). Esta redução de produtividade em Jaboticabal, constatada nestes três períodos, está relacionada, possivelmente, com o efeito alelopático de *U. ruzizensis* e pode-se inferir que alguns aleloquímicos presentes na palhada provavelmente foram lixiviados pelas chuvas (Figura 1), carregados para a solução do solo, atingindo concentrações suficientes para afetar negativamente a cultura da soja. A chuva contínua pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação; sabe-se que isto se aplica à algumas plantas produtoras de alcalóides, glicosídeos e até mesmo óleos voláteis (EVANS, 1996; WATERMAN; MOLE, 1994). Após os 12 DAA esse efeito inibitório não mais se manifestou. Segundo Putnam e Duke (1978), os aleloquímicos, para atuarem sobre os organismos, necessitam atingir a concentração mínima no meio, às quais esses são suscetíveis.

Para a redução de produtividade aos 25 DAA, explicações plausíveis se devem, provavelmente, ao surgimento de rebrotas e de novas plântulas de *U. ruzizensis* e, com a aplicação complementar de glyphosate na soja que se encontrava no estágio fenológico V2 (FEHR, 1971), cerca de 20 dias após a semeadura, ocorreu nova liberação de aleloquímicos de *Urochloa*, em quantidades mínimas para atuar negativamente na soja, concomitante a este efeito pode estar ocorrendo na convivência, competição por nutrientes entre a *Urochloa* e as plantas de soja.

**Tabela 4.** Efeito dos períodos de dessecação da *Urochloa ruziziensis* sobre a altura de plantas, altura de inserção da 1ª vagem, número de vagens por planta e produtividade da soja. Colina, 2008/09.

Cobertura vegetal	Época Dessec. (DAA)	Altura de plantas (cm)	Altura de inserção da 1ª vagem (cm)	Nº de vagens por planta	Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )
<i>Urochloa</i>	30	70,30 A <sup>1</sup>	25,90 A	35,20 A	3.006 A
	20	64,23 BC	23,47 A	34,90 A	3.143 A
	10	66,63AB	22,83 A	31,30 AB	3.160 A
	0	62,37 C	22,70 A	27,30 B	2.180 B
F bloco		1,41 NS	1,32	2,3 NS	5,41 *
F trat.		17,27**	1,08	5,00*	7,62 **
DMS		4,15	2,72	7,23	55,16
CV(%)		3,74	6,12	13,48	6,11

<sup>1</sup> Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS – não significativo pelo teste F, \*\*diferem em 1%, \*diferem em 5% de probabilidade  
DAA = Dias após a aplicação do glyphosate

Efeitos inibitórios sobre várias características agronômicas na cultura da soja como consequência da dessecação de *Brachiaria* spp., em épocas próximas à semeadura da soja, também foram encontrados por Santos et al. (2007) e Nunes et al. (2009), corroborando os resultados observados nesta pesquisa. Estes autores concluíram que a época mais adequada para o manejo químico de *B. ruziziensis* e *B. decumbens*, respectivamente, situa-se entre 7 e 14 dias antes da semeadura da soja. Silva et al. (2006) sugeriram que a dessecação de *B. brizantha* deve ser feita em períodos iguais ou maiores que 14 dias antes da semeadura da soja.



**Tabela 5.** Efeito das épocas de dessecação da *Urochloa ruziziensis* sobre a altura de plantas, altura de inserção da 1ª vagem, número de vagens por planta e produtividade da soja. Jaboticabal, 2009/10.

Cobertura Vegetal	Época Dessec. (DAA)	Altura de plantas (cm)	Altura de inserção da 1ª vagem (cm)	Nº de vagens por planta	Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )
<i>Urochloa</i>	25	76,76 AB <sup>1</sup>	23,02 A	37,07 AB	3.290 B
	20	79,89 A	23,61 A	40,50 A	3.445 AB
	16	79,31 A	22,14 A	40,62 A	3.545 A
	12	79,35 A	22,85 A	39,37 AB	3.542 AB
	07	76,20 AB	22,83 A	33,80 B	3.290 B
	0	71,20 B	21,75 A	32,66 B	3.288 B
F bloco		0,71 NS	1,08 NS	1,44 NS	0,26 NS
F trat.		3,54*	1,29 NS	5,07**	7,58 **
DMS		7,849	2,674	6,39	207,54
CV (%)		4,43	5,12	9,76	2,66

<sup>1</sup> Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS – não significativo pelo teste F, \*\*diferem em 1%, \*diferem em 5% de probabilidade.

DAA-Dias após a aplicação do glyphosate

A idade e o desenvolvimento da planta, bem como os diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos secundários produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes em mistura (BOWERS; STAMP, 1993; HENDRIKS et al., 1997; EVANS, 1996; JENKS et al., 1996; WILKINSON; KASPERBAUER, 1972). Sabe-se também que tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos secundários. Brum et al. (2009) avaliando uma substância, identificada como uma saponina esteroide, em diferentes fases do desenvolvimento de *B. decumbens* e *B. brizantha* (sementes, crescimento, floração, frutificação e queda das sementes),

concluíram que os teores foram maiores na fase de início do crescimento e na queda das sementes, enquanto nas sementes não foi encontrada essa substância .

Maciel et al.(2003) observaram respostas semelhantes em dois manejos: com palha de *B. decumbens* em superfície + irrigação superficial e com palha em superfície + irrigação subsuperficial, sobre área foliar, matéria seca e razão da área foliar na soja, e relataram que como o efeito foi praticamente idêntico descartaram a hipótese da lixiviação de compostos presentes na palhada via irrigação. Uma provável explicação para essas respostas semelhantes com a adoção de diferentes manejos é que os autores não consideraram o período compreendido entre a dessecação da *U. ruziziensis* e a coleta do material no campo, que foi de 30 dias após a dessecação, e nesse período pode ter ocorrido a lixiviação de substâncias alelopáticas hidrossolúveis contidas na *U. decumbens* por chuva e/ou orvalho.

Quando se analisa a redução de produtividade da soja ocorrida com o manejo “aplique e plante” (0 DAA) em Colina e em Jaboticabal (0 e 7 DAA), de 30% e 8%, respectivamente, estes resultados inferem a possível existência de aleloquímicos liberados pela *U. ruziziensis* durante esse período, e que a intensidade do efeito negativo foi maior em Colina devido a maior quantidade de cobertura vegetal ( $10 \text{ t ha}^{-1}$ ), enquanto em Jaboticabal foi de  $6 \text{ t ha}^{-1}$ ; atrelado a esse efeito da quantidade de cobertura, as chuvas ocorridas nesses períodos, que ultrapassaram os 80 mm dos 0 aos 7 DAA (Figura 1), pode ter auxiliado na lixiviação de aleloquímicos hidrossolúveis contidos na *U. ruziziensis*.

Deve-se lembrar que o efeito negativo observado, de modo geral, sobre as componentes de produtividade da soja devido à cobertura vegetal pode estar relacionado com a relação C/N. A menor intensidade do efeito negativo nas componentes produtivas da soja em Jaboticabal pode ser atribuída à menor quantidade de cobertura vegetal depositada sobre o solo, que, conseqüentemente, interferiu menos na dinâmica do nitrogênio disponível às plantas. No entanto, Souza et al. (2003), ao estudarem o efeito alelopático de plantas daninhas e de cinco concentrações de *B. decumbens* incorporadas ao solo no desenvolvimento inicial de *Eucalyptus grandis*, concluíram que os teores de nutrientes e as características químicas do solo foram

pouco alterados pelos tratamentos utilizados, sendo pouco provável que a redução do crescimento de *E.grandis* se deva às restrições nas quantidades de nutrientes disponíveis. Souza et al. (2006), avaliando os efeitos alelopáticos de *B. decumbens* sobre o crescimento inicial de milho, arroz, trigo, soja, feijão, algodão e a dinâmica do nitrogênio no solo, concluíram que a incorporação da matéria seca da parte aérea de *B. decumbens* reduziu significativamente os teores de nitrato no solo em todos os estudos realizados. Entretanto, segundo Maciel et al. (2003), esses efeitos não são observados quando se adota o sistema plantio direto.

Tanto para o experimento em Colina, quanto para o de Jaboticabal, em todos os manejos adotados, a massa de 100 grãos de soja não diferiu estatisticamente entre si, apresentando, em média, 17,60g (dados não apresentados). Esses resultados diferem dos encontrados por Nunes et al. (2009), nos quais a massa de 100 grãos de soja foi estatisticamente superior quando o manejo químico da *B. decumbens* foi realizado aos 14 e 7 dias antes da semeadura.

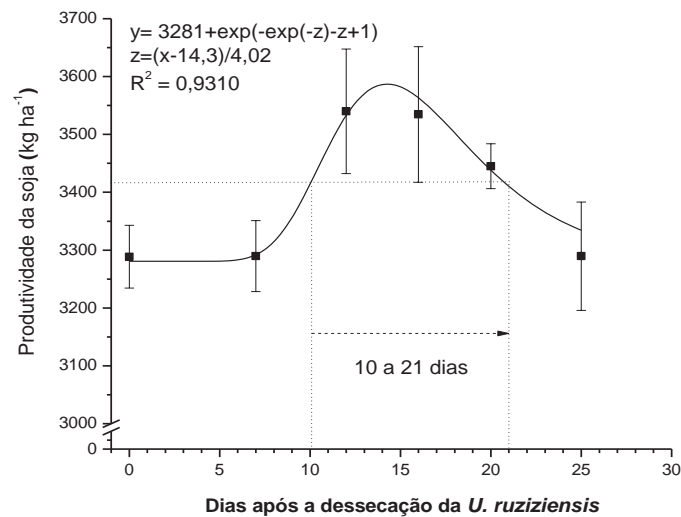
Em trabalho realizado por Oliveira Jr. et al. (2006), o controle de *Bidens pilosa* realizado na data da semeadura da soja ou dez dias antes prejudicou o desenvolvimento da cultura, resultando em queda na produtividade entre 10 e 20% se comparado ao manejo químico realizado aos 20 dias antes da semeadura. Ainda segundo esses autores, os métodos de controle complementar (manual, aplicação sequencial ou em dose única de herbicidas após a emergência da cultura) proporcionaram incremento de produtividade em relação a não realização do controle, o que reflete a interferência imposta pelas plantas daninhas na soja.

Foi realizada a estimativa do intervalo favorável, em função da significância dos dados observados para a produtividade de grãos, entre a dessecação de *Urochloa* e a semeadura da soja. Para Jaboticabal, esse intervalo situou-se entre 10 e 21 dias, sendo a produção máxima de 3.540 kg ha<sup>-1</sup> obtida aos 12 DAA e a estimada de 3.587 kg ha<sup>-1</sup> aos 14 DAA (Figura 2). Quando a semeadura foi realizada aos 0, 7 e 25 dias após a dessecação da *Urochloa*, ocorreu efeito negativo na produtividade, com perda média de 8% na produção de grãos. Para Colina, esse intervalo situou-se entre 8 e 24 dias, com produção máxima obtida de 3.142 kg ha<sup>-1</sup> aos 10 DAA e estimada de 3.223 kg ha<sup>-1</sup>

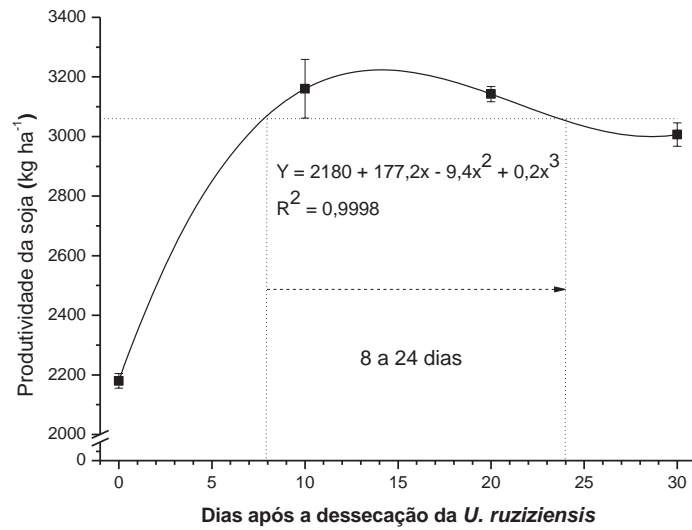
aos 14 DAA (Figura 3). Quando a semeadura foi realizada aos 0 e 30 dias após a dessecação da *Urochloa*, houve redução média de 18 % na produtividade da cultura.

## Conclusões

Nas condições em que foi realizada essa pesquisa, concluiu-se que na utilização de uma área com cobertura vegetal de *U. ruziziensis* é recomendável semear a soja em um período compreendido entre 10 e 20 dias após a dessecação da forrageira com glyphosate, considerando-se uma aplicação complementar deste herbicida no estágio V2 da cultura.



**Figura 2.** Produtividade da soja (kg ha<sup>-1</sup>), em Jaboticabal (2009/10), relacionada com os períodos de dessecação, com glyphosate, de *U. ruziziensis* antecedendo a semeadura da soja. Jaboticabal, 2010.



**Figura 3.** Produtividade da soja (kg ha<sup>-1</sup>), em Colina (2008/9), relacionada com os períodos de dessecação, com glyphosate, de *U. ruziziensis*, antecedendo a semeadura da soja.

### **CAPÍTULO 3 - ÉPOCA DE DESSECAÇÃO DE *Urochloa ruzizensis* E EFEITO DA QUANTIDADE E DO POSICIONAMENTO DE SUA PALHA NA NODULAÇÃO E NAS CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS DA SOJA M-SOY 7908 RR**

**RESUMO** - Com o objetivo de avaliar a nodulação, o desenvolvimento e características produtivas da soja transgênica, cultivar M-SOY 7908 RR, em função da quantidade e da incorporação ou deposição na superfície do solo da cobertura morta de *U. ruzizensis* dessecada com glyphosate em diferentes épocas antecedendo a semeadura da cultura, foram conduzidos três experimentos sob condições semi controladas, no Laboratório de Biologia e Manejo de Plantas Daninhas da FCAV-UNESP. No primeiro experimento os tratamentos constituíram da incorporação ou deposição na superfície do solo de três quantidades de cobertura vegetal (palha) de *U. ruzizensis* dessecada com glyphosate, sendo T1, T2 e T3, respectivamente, a 2,5; 5,0 e 10 t ha<sup>-1</sup> de palha de *U. ruzizensis* na superfície e T4, T5 e T6, 2,5; 5,0 e 10 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente, de *U. ruzizensis* incorporada ao solo a 10 cm de profundidade. No segundo experimento, os tratamentos constaram de três épocas de dessecação da *Urochloa*: 0 dias antecedendo a semeadura da soja (DAS), 7 DAS e 12 DAS, com uma testemunha sem *Urochloa*. Para o terceiro experimento, os tratamentos foram: T1 dessecação aos 5 DAS; T2 - dessecação aos 5 DAS mas antes de semear a soja retirou-se da parcela a parte aérea da *Urochloa*, deixando-se as raízes; T3 dessecação aos 10 DAS; T4 dessecação aos 10 DAS mas retirou-se a parte aérea da *Urochloa* e T5 dessecação aos 0 DAS. As características avaliadas foram massa seca de raízes, nódulos e parte aérea (folhas e caule), número de nódulos e de vagens e produtividade. Para todos os ensaios, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. A deposição da palha de *U. ruzizensis* oriunda da dessecação com glyphosate na superfície do solo favoreceu a nodulação e o crescimento da parte aérea das plantas de soja M-SOY 7908 RR, enquanto a incorporação, já a partir de 2, 5 t ha<sup>-1</sup>, causou efeitos deletérios. A dessecação de *U. ruzizensis* dos 0 aos 7 dias antecedendo a semeadura da soja M-SOY 7908 RR foi prejudicial a nodulação e a cultura, devido principalmente a parte aérea da gramínea, inclusive reduzindo sua produtividade.

**Palavras-chave:** *Brachiaria ruzizensis*, *Glycine max*, cobertura vegetal, plantio direto, glyphosate.

## Introdução

O sistema de plantio direto (SPD) tem demonstrado eficiência no controle da erosão, através da manutenção de resíduos vegetais na superfície do solo, propiciando também o aumento da disponibilidade de nutrientes (ALVARENGA (1996), citado por NUNES et al. (2006). Todavia, Nunes et al. (2006) ressaltam que o SPD implica no conhecimento e definição das espécies para cobertura, as quais devem ter boa produção de biomassa e ser suficientemente persistentes, para proteção física do solo e disponibilização de nutrientes. Andrade et al. (2009) afirmam que estratégias de manejo que mantêm ou adicionam carbono ao solo melhoram a qualidade física deste e que culturas agregadoras e com sistema radicular agressivo podem minimizar os efeitos negativos da degradação do solo, em especial as gramíneas.

Desde 2003 o Brasil figura como o segundo produtor mundial de soja, responsável por 26,8% da safra mundial (EMBRAPA, 2005). Considerando a soja uma das principais alternativas para a reforma e recuperação de pastagens degradadas, a interação agricultura – pecuária torna-se vantajosa para o agricultor.

Na busca por boas espécies de cobertura do solo, as espécies do gênero *Urochloa* aparecem como alternativas viáveis e de excelente qualidade, e vem se tornando importantes aliadas para a formação de cobertura vegetal (palha) no SPD (SILVA et al., 2004; TIMOSSI et al., 2006). Entretanto, vários agricultores relatam redução de crescimento, amarelecimento e diminuição na produção da soja quando os resíduos vegetais de *Urochloa* são incorporados ao solo (MACIEL et al., 2003). Souza et al. (2003) citam que em observações a campo o capim-braquiária (*U. decumbens*) demonstrou ser prejudicial quando incorporado ao solo, nas áreas de implantação de mudas de eucalipto. Souza et al. (2006), utilizando incorporação de capim-braquiária (*U. decumbens*) sobre o crescimento de sete plantas cultivadas, dentre elas a soja, constataram a redução drástica de nitrato no solo ao término dos experimentos. Contudo, Silva et al. (2009) destacaram *Urochloa brizantha* como boa espécie na ciclagem de nutrientes.

No sistema de reforma de pastagens, em que *Urochloa* é utilizada como cobertura vegetal para o plantio direto, esta é dessecada com herbicidas de manejo, como o glyphosate. Analisando o desenvolvimento da soja resistente ao glyphosate sobre épocas de dessecação anterior a semeadura, Santos et al. (2007) concluíram que a dessecação da *U. brizantha* com a semeadura da soja no mesmo dia, além de ter afetar o desenvolvimento da cultura, promoveu efeito negativo na atividade de microrganismos do solo, e destacaram que o intervalo entre as duas práticas, dessecação da cobertura vegetal seguida da semeadura da cultura deve ser de pelo menos sete dias.

Com a expansão do plantio direto e, mais recentemente, os avanços biotecnológicos que permitiram a comercialização de cultivares de plantas geneticamente modificadas tolerantes ao herbicida à base de glyphosate, como é o caso da soja, essas práticas causaram o aumento do uso deste herbicida nos agrossistemas, elevando assim a presença dessa molécula no ambiente, especialmente no solo. Isto traz preocupação, pois o uso generalizado do glyphosate pode contaminar o solo e a água e impactar os componentes bióticos do ecossistema, especialmente a microbiota do solo e os microrganismos simbiotes radiculares, como as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), os quais ocorrem invariavelmente associados às raízes da soja, exercendo grande influência na nutrição e sanidade dessa cultura (SIQUEIRA et al., 2004).

O glyphosate, é o herbicida de maior participação no mercado mundial, caracterizando-se pelo amplo espectro de ação e por não ser seletivo à cultura da soja. Existem mais de 90 marcas comerciais com esse ingrediente ativo no mundo (HEAP, 1997). Por inibir a síntese da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), a molécula de glyphosate bloqueia a síntese de aminoácidos aromáticos. Cultivares de soja resistentes ao glyphosate contém a enzima EPSPs insensível ao herbicida; todavia, as bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, associadas ao sistema radicular da soja, do gênero *Bradyrhizobium* não apresentam essa insensibilidade enzimática, podendo o glyphosate interferir na interação simbiótica.



Segundo Gonzalez et al. (1996), o risco de intoxicação de herbicidas sobre os microrganismos é maior quando os produtos inibem processos bioquímicos comuns entre as plantas e os microrganismos. Os efeitos fisiológicos nas cultivares de soja transgênica resistente ao glyphosate (RR) podem variar, segundo Zablutowicz e Reddy (2004), em função de fatores como localização geográfica, condições ambientais, tipos de solo, população de rizóbios, entre outros.

Os impactos do glyphosate na microbiota e os processos biológicos do solo têm sido estudados, mas de forma indireta, com pesquisas que envolvem comunidades heterotróficas (BUSSE et al., 2001). Com raras exceções, esses estudos não revelaram efeito adverso prolongado deste herbicida no solo (WARDLE; PARKINSON, 1990, 1991). Há relatos de efeitos inibitórios sobre microrganismos em meio de cultura (QUINN et al., 1988; GORLACH-LIRA et al., 1997), havendo também casos de estímulo ao crescimento microbiano heterotrófico (ROSLYCKY, 1982).

Para bactérias fixadoras de nitrogênio em vida livre, os efeitos do glyphosate variam muito em função das espécies e estirpes estudadas (HAAHTELA et al., 1988; SANTOS; FLORES, 1995; OLIVEIRA JR. et al., 2008). Na soja transgênica, além do material vegetal, outras variáveis, como o grupo de maturação ou a modalidade de aplicação do glyphosate são de grande importância, pois associam cada parte do desenvolvimento da planta (variáveis-resposta) a uma determinada fonte de variação (OLIVEIRA JR. et al., 2008).

No caso de rizóbio, o crescimento, a sobrevivência, a nodulação e a atividade da nitrogenase têm sido avaliados em diversos trabalhos, que revelam resultados inconsistentes, e que variam de acordo com as doses aplicadas, espécies/estirpes estudadas e condições experimentais, como em meios artificiais (MARTENSSON, 1992; MOORMAN et al., 1992), ou em solos (MALLIK; TESFAI, 1985; MOORMAN, 1986).

Recentemente, Santos et al. (2004) observaram respostas diferenciadas no crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. nativas do Brasil em razão da aplicação de diferentes formulações comerciais do glyphosate, revelando a importância de se considerar os adjuvantes desses herbicidas nessas avaliações de impactos.

King et al. (2001) testaram o efeito do glyphosate sobre plantas totalmente dependentes da nodulação para obtenção de nitrogênio e plantas supridas com nitrogênio mineral. Observaram decréscimo na biomassa da parte aérea das plantas supridas ou não com nitrogênio. Esse fato sugere um possível efeito direto negativo do glyphosate sobre a produção de matéria seca da parte aérea, sem que a redução na nodulação seja a principal responsável por esse decréscimo. Reddy et al. (2000) também encontraram redução da matéria seca tanto da parte aérea quanto do sistema radicular de plantas de soja RR tratadas com glyphosate em comparação com a testemunha sem herbicida; no entanto, os resultados só foram possíveis com o dobro da dose máxima utilizada por King et al. (2001), mostrando assim a existência de certa injúria que o glyphosate ocasionou sobre plantas de soja RR tratadas com doses elevadas.

Os pesquisadores Johal e Huber (2009) alertam que o uso extensivo do glyphosate em culturas geneticamente modificadas ameaça a sustentabilidade agrícola, pois esta adoção de manejo repetitivo vem gerando efeitos indesejáveis sobre a eficiência nutricional e predispondo a planta à doença. Um aumento significativo na severidade da doença associada com aplicações do glyphosate pode ser resultado do enfraquecimento direto da defesa da planta induzida pelo herbicida e, com isso, aumenta a população dos patógenos e favorece as virulências. Os efeitos indiretos do glyphosate relacionados com a predisposição à doença resultantes principalmente da imobilização de nutrientes específicos envolvidos na resistência às doenças, são a redução no crescimento e no vigor da planta. Segundo estes autores, estratégias para amenizar o efeito do glyphosate incluem seleções criteriosas das doses de aplicação do herbicida, pois as doses recomendadas são muitas vezes bem superiores à necessária para o controle de plantas daninhas; adequação de micronutrientes; desintoxicação do glyphosate nos tecidos meristemáticos e no solo; mudanças nas práticas culturais para melhorar a disponibilidade de micronutrientes para a absorção da planta e alteração biológica com microrganismos nitrificantes resistentes ao glyphosate para uma adequada nutrição da planta.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são de ocorrência generalizada, especialmente nos trópicos, infectando a maioria das plantas e trazendo benefícios para estas (SOUZA et al., 1999). O efeito da aplicação do glyphosate sobre microrganismos, tanto rizóbios como FMA vem sendo investigado por alguns autores (KAPS; KUHNS (1987), MORANDI (1989), MOORMAN; DOWLER (1991), SANTOS et al. (2003, 2004 e 2005) e SILVA et al. (2006).

Avaliando o efeito do herbicida glyphosate sobre estirpes de *Bradyrhizobium* spp. e de FMA, em meio de cultivo com doses crescentes do herbicida Maly et al. (2006) concluíram que: a inibição no crescimento de *Bradyrhizobium* spp., em meio de cultura, varia em razão das estirpes estudadas e só ocorre em concentração muito superior àquelas normalmente utilizadas em condições reais de campo; e que a estirpe de *B. japonicum* (BR 86) apresentou maior sensibilidade que as estirpes de *B. elkanii* (BR 29, INPA 80A e INPA 553A). Quanto às micorrizas, a germinação e o crescimento dos tubos germinativos dos esporos, das espécies de FMA, em ágar-água, mostraram comportamento diferente em relação às doses de glyphosate. A aplicação prévia de glyphosate ao solo, até a dose equivalente a 3,60 kg e.a. ha<sup>-1</sup>, não influenciou na nodulação e na colonização micorrízica da soja.

Um aspecto relevante, em se tratando da simbiose micorrízica na cultura da soja, é a associação fungo micorrízico-rizóbio. São relatados efeitos positivos desta interação (PACOVSKY et al., 1986), consequência de melhor nutrição da planta resultante, por exemplo, do acesso facilitado de fósforo às raízes (BETHLENFALVAY; YODER (1981), e/ou do fornecimento desse nutriente aos bacterióides (BERGERSEN, 1971).

## **Objetivos:**

### **Geral:**

Avaliar a nodulação, o desenvolvimento e características produtivas da soja transgênica, cultivar M-SOY 7908 RR, em função da quantidade e da incorporação ou deposição na superfície do solo da cobertura morta de *U. ruziziensis* dessecada com glyphosate em diferentes épocas antecedendo a semeadura da cultura.

**Específicos:**

- Avaliar o efeito da quantidade de cobertura morta de *U. ruziziensis* dessecada com glyphosate incorporada ao solo ou depositada sobre ele sobre a nodulação e o desenvolvimento da soja M-SOY 7908 RR.

- Avaliar o efeito da época de dessecação de *U. ruziziensis* com glyphosate antecedendo a semeadura sobre a nodulação e o desenvolvimento da soja M-SOY 7908 RR.

- Avaliar o efeito da época de dessecação de *U. ruziziensis* com glyphosate antecedendo a semeadura sobre a produtividade e características produtivas da soja M-SOY 7908 RR.

**Material e Métodos**

Três experimentos foram instalados e conduzidos em área pertencente ao Laboratório de Biologia e Manejo de Plantas Daninhas (DBAA), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Jaboticabal - SP, Brasil, que se encontra à latitude de 21°15'22"S, longitude de 48°18'58"W e altitude de 595 m.

**Experimento I**

Para este experimento foram coletadas partes aéreas de *U. ruziziensis* em área de pastagem estabilizada na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Pólo Alta Mogiana, Colina – SP, em fevereiro, 30 dias após a dessecação da pastagem com glyphosate (1.440 g de e.a. ha<sup>-1</sup>), sendo estas acondicionadas em sacos plásticos e transportadas até o laboratório, onde foram secas a sombra até obtenção de massa seca constante, para uso posterior desta palha.

Este experimento foi instalado e conduzido de 10 de julho a 11 de setembro de 2008. Como parcela experimental, foram utilizados vasos plásticos com capacidade para 10 litros preenchidos com substrato proveniente de um Latossolo Vermelho

Eutrófico típico de textura argilosa (ANDRIOLI; CENTURION, 1999), sendo que o solo foi peneirado para retirada das impurezas mais grosseiras e torrões. No ensaio não foi necessária calagem, pois o mesmo se encontrava em condições adequadas para a semeadura da soja, segundo resultados da análise química preliminar do solo.

Os tratamentos constituíram da incorporação ou deposição na superfície do solo de três quantidades de cobertura vegetal (palha) de *U. ruziziensis*, sendo T1, T2 e T3, respectivamente, a 2,5; 5,0 e 10 t ha<sup>-1</sup> de palha de *U. ruziziensis* na superfície e T4, T5 e T6, 2,5; 5,0 e 10 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente, de *U. ruziziensis* incorporada ao solo a 10 cm de profundidade (Tabela 6). A palha de *Urochloa*, adicionada ao solo ou colocada sobre a superfície, foi previamente fracionada manualmente, com utilização de uma tesoura, em partes de 3 cm de comprimento, aproximadamente.

**Tabela 6.** Descrição dos tratamentos experimentais.

Tratamentos	Descrição
T1	2,5 t ha <sup>-1</sup> de cobertura vegetal de <i>U. ruziziensis</i> na superfície
T2	5,0 t ha <sup>-1</sup> de cobertura vegetal de <i>U. ruziziensis</i> na superfície
T3	10 t ha <sup>-1</sup> de cobertura vegetal de <i>U. ruziziensis</i> na superfície
T4	2,5 t ha <sup>-1</sup> de cobertura vegetal de <i>U. ruziziensis</i> incorporada ao solo a 10 cm de profundidade
T5	5,0 t ha <sup>-1</sup> de cobertura vegetal de <i>U. ruziziensis</i> incorporada ao solo a 10 cm de profundidade
T6	10 t ha <sup>-1</sup> de cobertura vegetal de <i>U. ruziziensis</i> incorporada ao solo a 10 cm de profundidade

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos em quatro repetições, totalizando vinte e quatro parcelas experimentais.

A semeadura da soja foi manual em 10 de julho de 2008, depositando-se seis sementes por vaso, a 3 cm de profundidade, com desbaste aos 7 dias após a emergência, deixando-se três plântulas por vaso.

A cultivar de soja utilizada foi a M-SOY 7908 RR, que possui hábito de crescimento determinado, com maturação precoce, cor de flor branca, cor da pubescência marrom, cor do hilo preta, altura média das plantas de 70 cm, altura média de inserção de vagens de 12 cm, sendo recomendada para os estados de SP (norte), MG (triângulo e noroeste), GO e MS (sul). É resistente ao cancro da haste, mancha olho de rã, pústula bacteriana, e ao nematóide *Meloydogine javanica*, moderadamente resistente ao acamamento, crestamento bacteriano e oídio, e suscetível aos nematóides *Meloydogine incognita* e *Heterodera glycines*.

Aos 61 dias após a semeadura, quando as plantas de soja se encontravam no estágio fenológico V6, estas foram cortadas rente ao solo, coletadas e devidamente acondicionadas em sacos plásticos. O conjunto solo e raízes de cada vaso foi lavado em água corrente com o auxílio de uma peneira, para a separação e limpeza das raízes. Em seguida, os nódulos de rizóbio presentes nas raízes foram destacados e contados. As raízes, nódulos e parte aérea (folhas e caule) foram acondicionados separadamente em sacos de papel e secos em estufa de ventilação forçada de ar a 70° C, até atingir massa constante.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## **Experimento II**

O segundo experimento foi conduzido utilizando-se solo coletado de uma área de pastagem de *U. ruzizensis* pertencente à Fazenda de Pesquisa e Ensino da UNESP, Campus de Jaboticabal. Este solo, juntamente com as plantas de *Urochloa* previamente dessecadas, simulando uma semeadura direta da soja na cobertura dessecada, foi acondicionado em vasos com capacidade para 10 litros. Os tratamentos constaram de três épocas de dessecação da *Urochloa*: 0 dias antecedendo a semeadura da soja (DAS), 7 DAS e 12 DAS, com uma testemunha sem *Urochloa*.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos em seis repetições.

Para dessecação da *Urochloa* no campo, foi aplicado 1.440 g de e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate por meio de pulverizador costal pressurizado munido de barra com seis pontas de jato plano (TT 110.02), espaçados de 0,5 m, com consumo de calda equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup> à pressão constante de 2,24 kgf cm<sup>-2</sup>.

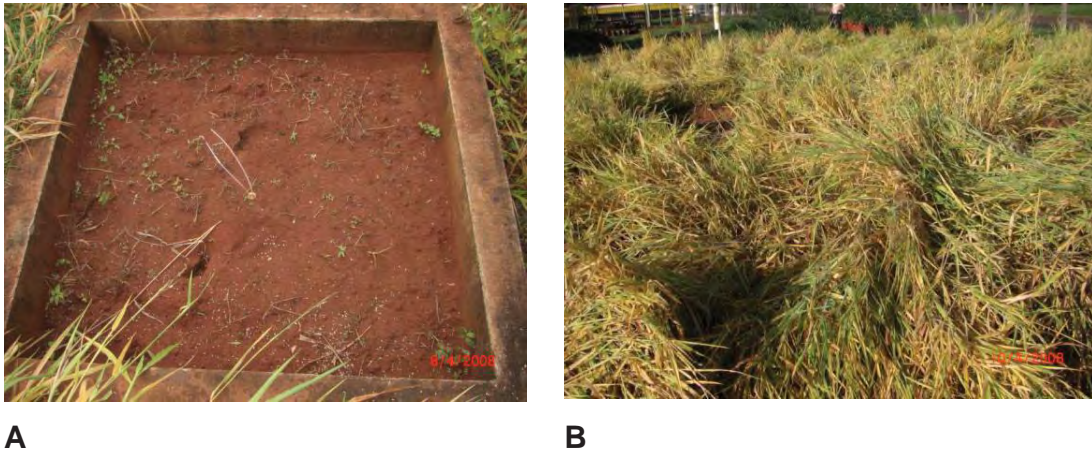
A cultivar de soja utilizada foi a M-SOY 7908 RR, cujas sementes foram previamente tratadas com fungicida (thiabendazole, na dosagem de 150 g p.c./100kg de sementes e thiram, na dosagem de 280 ml p.c./100kg de sementes). Em seguida, as sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*, na dosagem de 200 g de produto comercial (Urelec) por 100 kg de sementes. A semeadura foi realizada manualmente, depositando-se oito sementes por vaso, a 3 cm de profundidade, com desbaste aos 7 dias após a emergência, deixando-se quatro plântulas por vaso, correspondendo a 24 sementes por metro.

Aos 46 DAS, quando as plantas de soja se encontravam no estágio fenológico V5, estas foram cortadas rente ao solo, coletadas e devidamente acondicionadas em sacos plásticos. Na sequência, os procedimentos e as características analisadas foram os mesmos descritos no ensaio I.

### **Experimento III**

Para o terceiro experimento foram utilizadas molduras de cimento diretamente sobre o solo (Latosolo Vermelho eutrófico típico de textura argilosa), correspondendo a quadrados com área de 1,33 m<sup>2</sup>, que constituíram as parcelas experimentais (Figura 4A). Em cada parcela foi semeada *Urochloa ruziziensis* a lanço em julho de 2008 para formação de cobertura vegetal, que foi dessecada ao final de novembro de 2008, para a semeadura da cultivar de soja M-SOY 7908 RR. Durante o período de desenvolvimento, a gramínea não sofreu restrição hídrica, sendo frequentemente irrigada.





**Figura 4.** Detalhe da parcela experimental, sem (A) e com (B) as plantas de *Urochloa ruziziensis* aos seis dias após a dessecação.

A dessecação da *Urochloa* foi realizada aos 10, 5 e 0 dias antecedendo a semeadura da soja. Para a dessecação foram utilizados 1,440 kg e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate, empregando-se um pulverizador costal de precisão, munido de barra com seis bicos de jato plano (TT 110.02), espaçados de 0,5 m, com consumo de calda equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup> à pressão constante de 2,24 kgf cm<sup>-2</sup>.

A cultivar de soja utilizada foi a M-SOY 7908 RR, semeada em uma única época, nos respectivos tratamentos. As sementes foram previamente tratadas com fungicida (thiabendazole, na dosagem de 150 g p.c./100kg de sementes e thiram, na dosagem de 280 ml p.c./100kg de sementes). Em seguida, as sementes foram inoculadas com *Bradyrizobium japonicum*, na dosagem de 200 g de produto comercial (Urelec) por 100 kg de sementes. A semeadura foi realizada manualmente, em duas linhas por parcela, com espaçamento entrelinhas de 0,45 m, a uma profundidade de 5 cm. Foram distribuídas 23 sementes por metro.

No decorrer do período experimental foram tomadas todas as medidas preventivas e curativas visando a boa sanidade da cultura.

Esse experimento foi constituído por cinco tratamentos, com cinco repetições, em que: T1 - dessecação aos 5 dias antes da semeadura da soja (DAS); T2 - dessecação aos 5 DAS, mas antes de semear a soja retirou-se da parcela a parte aérea da



*Urochloa*, mantendo-se as raízes; T3 dessecação aos 10 DAS; T4 dessecação aos 10 DAS, mas retirou-se a parte aérea da *Urochloa* e T5 dessecação aos 0 DAS. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado.

A colheita da soja foi manual, aos 130 dias após a semeadura, e a umidade dos grãos corrigida para 13%, com a qual que se calculou a produtividade e peso de 100 grãos. Nas plantas colhidas de cada parcela, além da produtividade, foi determinado o número total de vagens por parcela (1,33 m<sup>2</sup>).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Resultado e Discussão

### Experimento I

Na Figura 5A verifica-se, para as três quantidades de cobertura de *U. ruziziensis*, um incremento de 40% na massa seca da parte aérea das plantas de soja nos tratamentos em que a palha foi disposta na superfície do solo quando comparados aos tratamentos com a incorporação do material vegetal.

Estes resultados benéficos, na utilização da cobertura vegetal em superfície, são práticas conservacionistas, adotadas no sistema de plantio direto, que vem demonstrando eficiência no aumento da disponibilidade de nutrientes (ALVARENGA, 1996), no fornecimento de N pela decomposição da matéria orgânica, e maior quantidade de água disponível no solo (STONE; MOREIRA, 2000; FAGERIA; STONE, 2004).

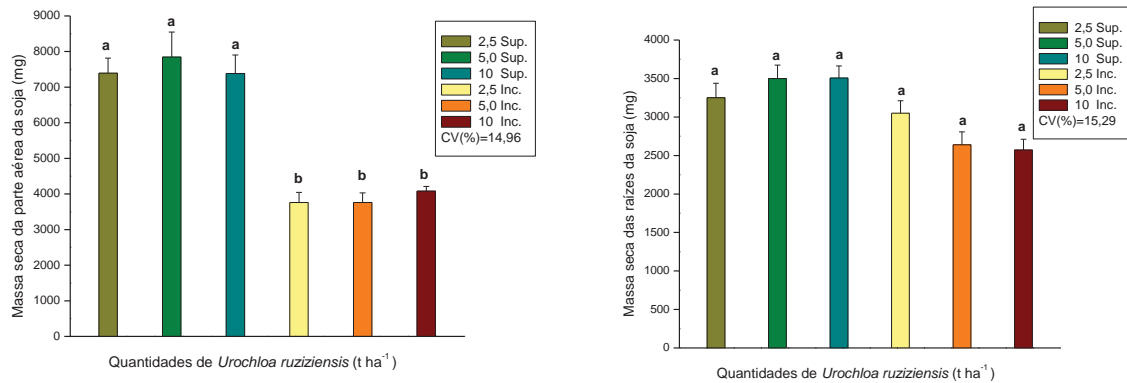
Efeito negativo sobre o crescimento inicial de *Eucalyptos grandis* quando *Urochloa decumbens* foi incorporada ao solo foi verificado por Souza et al. (2003). Esses resultados também corroboraram os encontrados por Souza et al. (2006), que, ao avaliarem o efeito alelopático de *U. decumbens* sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas, dentre elas a soja, concluíram que a trituração e incorporação da parte aérea de *U. decumbens* diminuíram o crescimento inicial de

todas as plantas estudadas, além de diminuir os teores de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) no solo. Os autores citam como sendo causas da restrição no desenvolvimento das plantas essa alteração na disponibilidade de nitrato, mas não descartam a possibilidade da liberação de agentes tóxicos (aleloquímicos) no solo durante a decomposição da *U. decumbens*.

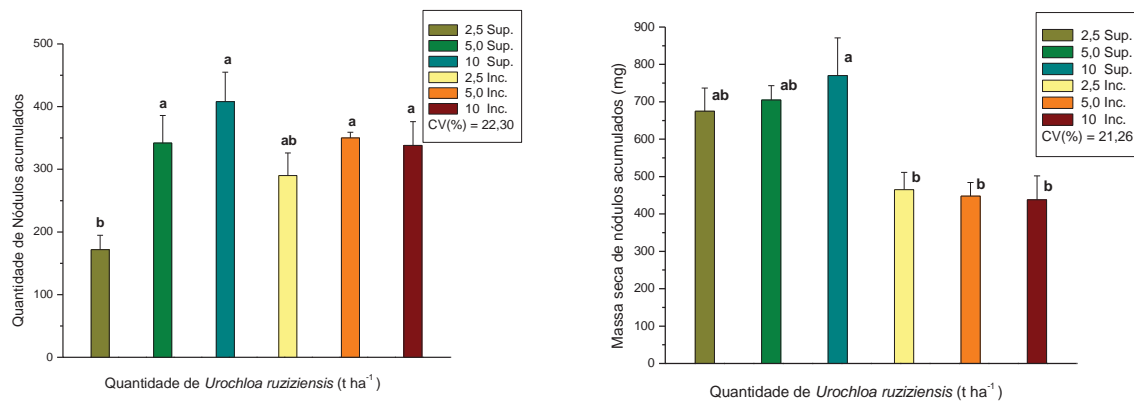
Maciel et al. (2003), utilizando  $6,0 \text{ t ha}^{-1}$  de palha de *U. decumbens* em soja e em *Euphorbia heterophylla* (amendoim-bravo), disposta na superfície do solo ou incorporada a 10 cm de profundidade, associados ao uso de irrigação superficial e subsuperficial e uma testemunha, sem cobertura, observaram que não houve diferenças significativas nos tratamentos quando avaliaram a área foliar, matéria seca e razão de área foliar aos vinte dias após a emergência da soja. Resultados semelhantes foram encontrados para o desenvolvimento inicial do amendoim-bravo, evidenciando que esta planta daninha deverá continuar sendo considerada problema em cultivos com palha, como no SPD.

Quanto aos resultados de massa seca das raízes das plantas de soja (Figura 5B) observa-se, em média, acréscimo de 21% nas plantas dos tratamentos em que se manteve a palha depositada sobre o solo em relação aos quais a palha de *Urochloa* foi incorporada ao solo, embora não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos.

Na Figura 6A encontram-se os resultados referentes ao número total de nódulos nas raízes das plantas de soja. Observa-se que em T1 ( $2,5 \text{ t ha}^{-1}$  de *U. ruzizensis* na superfície do solo), o número de nódulos acumulados (172) foi inferior ao dos demais tratamentos, que, em média, atingiram 327 nódulos, quase o dobro do valor obtido em T1. No entanto, esta redução ocorrida no número de nódulos em T1 foi compensada pelo tamanho e massa dos nódulos (Figura 6B), pois em T1 os nódulos apresentavam-se maiores e com maior massa que os dos demais tratamentos. Fontaneli et al. (2000), avaliando o rendimento e nodulação da soja em plantio direto sobre quatro forrageiras anuais de inverno, aveia-branca, aveia-preta, ervilhaca e trigo, não constataram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em relação à nodulação da soja.



**Figura 5.** Massa seca da parte aérea (A) e das raízes (B) das plantas de soja, cultivar M-SOY 7908 RR, em resposta às distintas quantidades de cobertura vegetal de *Urochloa ruziziensis* na superfície ou incorporada ao solo. Jaboticabal, SP, 2011.



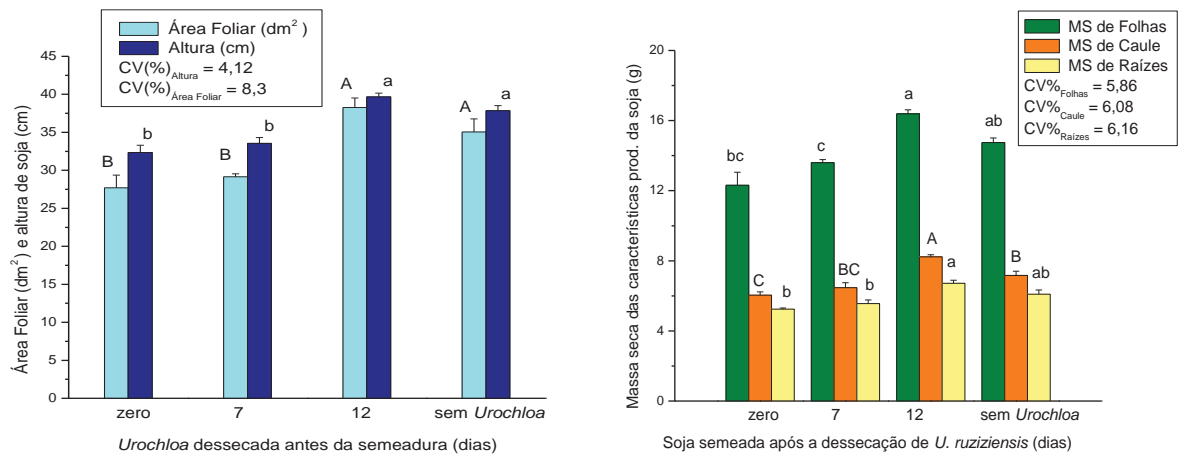
**Figura 6.** Número de nódulos acumulados (A) e massa seca de nódulos acumulados (B) nas raízes da soja, cultivar M-SOY 7908 RR em resposta às quantidades de palha de *Urochloa ruziziensis* na superfície ou incorporada ao solo. Jaboticabal, SP, 2011.

A massa seca de nódulos, nos tratamentos em que a cobertura vegetal de *U. ruzizensis* foi mantida sobre a superfície do solo (T1, T2 e T3), foi, em média, 37% maior quando comparada com a dos tratamentos com incorporação da palha ao solo. A massa seca de nódulos em T1, T2 e T3 foi, em média, de 0,240 g planta<sup>-1</sup>, enquanto para T4, T5 e T6 foi de 0,150 g planta<sup>-1</sup>. Esses valores encontrados para massa seca de nódulos por planta são inferiores ao relatado por Fontaneli et al. (2000), que obtiveram 0,361 g planta<sup>-1</sup>, sendo esta considerada uma massa seca de nódulos elevada. Os autores afirmam que para uma boa fixação biológica de N não basta apenas uma grande quantidade de nódulos; é necessário que os mesmos sejam formados por estirpes eficientes de *Bradyrhizobium* spp. Brandelero et al. (2009), ao avaliarem a nodulação de diferentes cultivares de soja e seus efeitos no rendimento de grãos, evidenciam que a nodulação tem estreita relação com o rendimento final de grãos entre as cultivares estudadas.

Os resultados das características produtivas da soja, principalmente os de massa seca da parte aérea e de nódulos, foram menores nos tratamentos em que *Urochloa* foi incorporada ao solo. Provavelmente, este efeito deletério na cultura da soja esteja relacionado com produtos alelopáticos existentes na cobertura vegetal de *Urochloa*, solúveis em água, e que quando incorporados ao solo ficam disponíveis na solução do solo, inicialmente em concentrações elevadas.

## Experimento II

Na Figura 7A estão apresentados os resultados dos efeitos da época de dessecação da *Urochloa ruzizensis* sobre a área foliar e a altura das plantas de soja. Observa-se que a altura das plantas e a área foliar foram afetadas pelas épocas de dessecação, com redução acentuada na área foliar, em média 33,8%, nos tratamentos em que se dessecou e semeou a soja no mesmo dia (aplique e plante) e com a semeadura aos 7 dias após a dessecação (DAS).



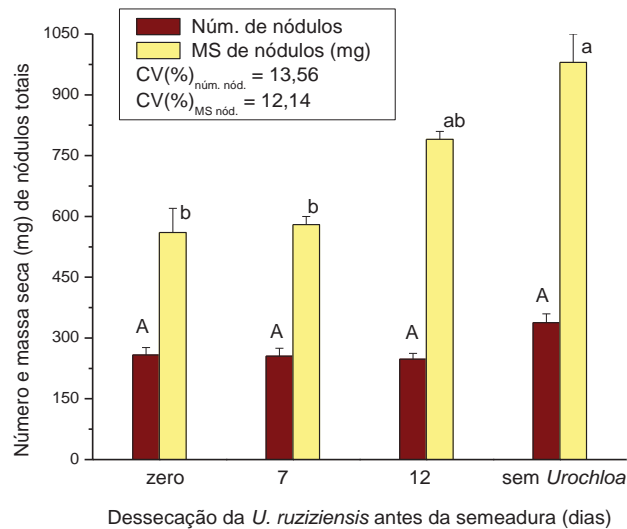
A

B

**Figura 7.** Área foliar (dm<sup>2</sup>) e altura de plantas (cm) (A) e massa seca de folhas, caules e raízes (B) da soja, cultivar M-SOY 7908 RR, em resposta às épocas de dessecação de *Urochloa ruziziensis* com glyphosate. Jaboticabal, SP, 2011.

Ao comparar as características de massa seca de folhas, caules e raízes em decorrência dos tratamentos (Figura 7B), observa-se diferença significativa entre as plantas de soja que foram semeadas imediatamente após a dessecação e aos 7 DAS quando comparada à semeadura aos 12 DAS, com reduções atingindo 25, 31 e 20%, respectivamente, para massa seca das folhas, dos caules e das raízes.

O número de nódulos não foi afetado pelas épocas distintas de dessecação (Figura 8). No entanto, a massa seca dos nódulos acumulados, nos tratamentos com dessecação aos 12 DAS e sem cobertura vegetal no solo superaram em 28 e 43%, respectivamente, os tratamentos com dessecação aos 0 e 7 DAS. É plausível inferir que o menor intervalo de tempo entre a dessecação e a semeadura da soja esteja proporcionando maior translocação do glyphosate da planta dessecada para as plântulas de soja emergentes, afetando assim o desenvolvimento do sistema radicular, a fixação biológica de nitrogênio, assim como as micorrizas. King et al. (2001) relataram que a aplicação do glyphosate aumentou o número e diminuiu a massa dos nódulos.



**Figura 8.** Número e massa seca de nódulos de rizóbio na soja, cultivar M-SOY 7908 RR, em resposta às épocas de dessecação de *Urochloa ruziziensis* com glyphosate. Jaboticabal, SP, 2011

Trabalhando com intervalo entre as dessecações da cobertura vegetal com glyphosate, Lucio et al. (2007) observaram que o aumento de intervalo entre as dessecações proporcionou maior número de nódulos, maior altura da planta e maior massa seca das raízes em relação ao sistema aplique e plante.

Estudando o efeito do glyphosate aplicado ao solo, Maly et al. (2006) concluíram que doses crescentes de glyphosate equivalentes a 0,45; 0,90; 1,8; 2,7 e 3,6 kg ha<sup>-1</sup> aplicadas dez dias antes da semeadura da soja convencional não influenciaram na nodulação, na colonização micorrízica e na matéria seca da parte aérea das plantas aos 17, 31 e 45 dias após a semeadura.

Resumidamente, pôde-se observar melhor desenvolvimento das plantas de soja semeadas aos 12 dias após a dessecação de *U. ruziziensis* com glyphosate (tratamento 12 DAS) relacionado, provavelmente, com a lixiviação de substâncias alelopáticas com as chuvas que antecederam a semeadura, restando uma palha da *Urochloa ruziziensis* inerte que proporcionou vários benefícios à cultura da soja.

### Experimento III

Como pode ser verificado na Tabela 7, a dessecação da *Urochloa* aos 0 e 5 dias antecedendo a semeadura da soja proporcionou redução no número de vagens por planta, no peso de 100 grãos e, conseqüentemente, na produtividade, sendo que, no tratamento em que ocorreu a remoção da parte aérea de *Urochloa* dessecada aos 5 DAS não ocorreu redução nestas características avaliadas. Este resultado demonstra que, provavelmente, as substâncias inibitórias se encontram, principalmente, na parte aérea das plantas de *Urochloa*, ou que as concentrações de substâncias deletérias para a cultura da soja, presentes nas raízes, não foram suficientes para manifestar inibição.

**Tabela 7.** Efeito dos tratamentos, em 1,33 m<sup>2</sup> de soja, sobre número de vagens, peso de 100 grãos e na produtividade. Jaboticabal, 2009.

Tratamentos	Número de vagens	Peso de 100 grãos (g)	Produtividade g 1,33 m <sup>-2</sup>
5 DAS	2.075 B	17,846 B	805,08 B
5 DAS sem parte aérea	2.428 AB	18,228 AB	1003,70 A
10 DAS	2.475 AB	18,966 A	1030,56 A
10 DAS sem parte aérea	2.680 A	18,204 AB	1005,30 A
0 DAS (aplique e plante)	2.119 B	17,684 B	809,08 B
F Trat.	4,41*	3,54*	9,26**
DMS	512,21	1,111	172,61
CV (%)	11,49	3,23	9,69

DAS = dias após a dessecação de *Urochloa ruziziensis*

### Conclusões

A deposição da cobertura vegetal (palha) de *Urochloa ruziziensis* oriunda da dessecação com glyphosate na superfície do solo favoreceu a nodulação e o

crescimento da parte aérea das plantas de soja transgênica M-SOY 7908 RR, enquanto a incorporação, já a partir de 2, 5 t ha<sup>-1</sup>, causou efeitos deletérios.

A dessecação de *Urochloa ruziziensis* dos 0 aos 7 dias antecedendo a semeadura da soja transgênica M-SOY 7908 RR foi prejudicial à cultura, devido principalmente a parte aérea da gramínea, inclusive reduzindo a massa seca dos nódulos de rizóbio e a produtividade desta.



### **CAPÍTULO 3 – SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE *Urochloa ruziziensis* E SEUS EFEITOS ALELOPÁTICOS**

**RESUMO** - Objetivou-se através da extração, isolamento e identificação de substâncias químicas da parte aérea de *Urochloa ruziziensis*, após a sua dessecação com glyphosate ou não, avaliar o efeito alelopático de seu composto majoritário sobre soja transgênica (*Glycine max* cv. M-SOY 7908 RR) e a sua possível relação com a precipitação pluvial. Plantas de *U. ruziziensis* em início de florescimento foram desseçadas com 1,44 kg ha<sup>-1</sup> de glyphosate e amostradas aos 5 e 10 dias após a dessecação, com uma testemunha sem a aplicação do herbicida. Da parte aérea seca e moída destas plantas foram confeccionados extratos em hexano, diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), nesta sequência de extração. Por meio de bioensaios de citotoxicidade utilizando os dois últimos extratos foi constatado que o MeOH foi mais inibitório que o DCM, independentemente da aplicação do glyphosate. Utilizando técnicas de cromatografia líquida em coluna, em camada delgada de média e alta performance fracionou-se o extrato MeOH, utilizando água e metanol como solventes. As frações MeOH/água 2:2 (v/v) e MeOH/água 3:1 (v/v) foram as mais inibitórias, novamente independentemente da aplicação do glyphosate, sendo a fração MeOH/água 2:2 (v/v) a mais fitotóxica para a soja. Desta fração foi isolado como composto majoritário a protodioscina, uma saponina esteroidal, que apresentou cito e fitotoxicidade nas plântulas de soja, inclusive quando comparada aos ácidos aconítico e o-cumárico, com concentrações de ID<sub>50</sub> de 97, 160 e 186 µM para massa seca de raízes, comprimento de raiz e de parte aérea, respectivamente. Foram isolados ainda outros dois glicosídeos da fração MeOH/água 3:1 (v/v). Pelas características das saponinas, plantas de *U. ruziziensis* mortas por dessecação com glyphosate ou não e expostas a chuvas podem apresentar menor teor de protodioscina e, conseqüentemente, menor atividade alelopática inibitória.

**Palavras-chave:** *Brachiaria ruziziensis*, dessecação, glyphosate, alelopatia, saponina esteroidal, protodioscina, *Glycine max*.

## Introdução

O Brasil possui extensas áreas de pastagens perenes, as quais são reformadas ou substituídas por culturas anuais, principalmente a soja, através do sistema plantio direto (SPD) ou com o preparo convencional (SOUZA et al., 2006). Desde 2003 o país figura como o segundo produtor mundial de soja, responsável por 26,8% da safra mundial (EMBRAPA, 2005).

As grandes extensões de área com monocultivo de soja no verão, a degradação das pastagens, os preços de insumos e produtos agrícolas, a pressão social sobre a terra e as divisas financeiras, vem exigindo cada vez mais eficiência dos produtores (MACEDO, 2009). Neste contexto, os sistemas de integração lavoura pecuária (SILP) são estratégias promissoras tanto para a pecuária, como alternativa de recuperação de pastagens degradadas, quanto para a agricultura de culturas anuais, através do SPD, visando a produção de cobertura vegetal e melhoria das propriedades químicas e físicas do solo, propiciando aumento da renda no campo (MACEDO, 2009).

A abertura de novas áreas agrícolas, principalmente nos cerrados, denominadas popularmente como novas fronteiras agrícolas, vem sendo inibida pela pressão da população sobre a questão ambiental. Com isso, os produtores estão optando por pacotes tecnológicos, nos quais estão inclusos, por exemplo, o SPD, a utilização de sementes de soja transgênica, dentre outros, que propiciem maiores produtividades.

Na busca por boas espécies de plantas para a cobertura do solo, o gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) aparece como alternativa viável e de excelente qualidade, e vem se tornando importante aliado para a formação de cobertura vegetal no SPD (SILVA et al., 2004; TIMOSSI et al., 2005).

No entanto, Nunes et al. (2006) ressaltam que para se direcionar espécies vegetais que forneçam uma adequada cobertura do solo são necessárias informações que esclareçam sobre o período ideal entre a dessecação e a semeadura da cultura, para que esta não influencie negativamente a cultura em sucessão.

A decomposição da cobertura vegetal resulta na produção e/ou liberação de compostos alelopáticos que afetam o crescimento de plantas daninhas (BARNES e

PUTNAM, 1983), mas que também podem prejudicar a cultura de interesse econômico (CHOU e PATRICK, 1976).

Gramíneas forrageiras do gênero *Urochloa* possuem atividade alelopática inibitória comprovada sobre a germinação de sementes e no desenvolvimento de plantas de diferentes espécies (SOUZA FILHO et al., 1997a; MARTINS et al., 2006; SOUZA et al., 2006). São comprovadas atividades alelopáticas tanto das sementes como da parte aérea, sendo a parte aérea a principal fonte de substâncias químicas com atividade potencialmente alelopática (SOUZA FILHO et al., 1997b).

De acordo com Olibone et al. (2006), as substâncias químicas liberadas pelos resíduos vegetais deixados sobre a superfície do solo, como o que ocorre no SPD, têm comportamento diferenciado em relação ao que ocorre pelo método de incorporação. Na incorporação, essas substâncias ficam diluídas no volume do solo correspondente à profundidade em que foram enterradas, enquanto no SPD elas se concentram na camada superficial. Desta forma, como a intensidade dos efeitos alelopáticos depende da concentração dos aleloquímicos, a sua ação é mais pronunciada no SPD.

No sistema de reforma de pastagens em que a *Urochloa* spp. é utilizada como cobertura vegetal para o plantio direto, esta é dessecada com herbicidas de manejo, sendo o glyphosate o mais empregado.

Todavia, tem sido relatado efeito do glyphosate prejudicando o desenvolvimento inicial das plantas de soja transgênica (OLIVEIRA JR. et al., 2006; SILVA et al., 2006) e, como explicação plausível, alegam que pode ser decorrente do aumento demasiado da dose aplicada do herbicida ou com o número de aplicações realizadas, principalmente em pós-emergência da soja, ou ainda que esteja relacionado com a época de aplicação ou possíveis interferências negativas sobre microrganismos (KAPS; KUHNS, 1987; MOORMAN et al. 1992, SILVA et al., 2006, OLIVEIRA JR. et al., 2008).

Santos et al. (2007), analisando o desenvolvimento da soja resistente ao glyphosate sob épocas de dessecação anterior a semeadura, concluíram que a dessecação da *B. brizantha* com a semeadura da soja no mesmo dia, além de ter afetado o desenvolvimento da cultura, promoveu efeito negativo na atividade de microrganismos do solo, e recomendam que o período entre as duas práticas,

dessecação da cobertura seguida de semeadura da soja, deve ter um intervalo mínimo de sete dias. Na mesma linha de pesquisa, resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira Jr. et al. (2006) e Nunes et al. (2009) quanto ao efeito negativo relacionado com os períodos de manejo da cobertura vegetal da *Brachiaria* e a semeadura da soja.

O estudo da alelopatia é de suma importância para possibilitar ao pesquisador identificar possíveis causas do insucesso no desenvolvimento de determinada cultura agrícola, como o efeito inibitório da palha de *Urochloa* sobre culturas subseqüentes que frequentemente tem sido relatado.

A alelopatia é um fenômeno que ocorre largamente em comunidades de plantas; envolve mecanismos por meio dos quais determinadas plantas interferem no desenvolvimento de outras por meio da liberação de substâncias químicas (aleloquímicos) no meio. Este comportamento pode se tornar, portanto, importante fator de manejo de culturas, pelo uso de plantas que exercem controle sobre determinadas espécies indesejadas, obtendo assim sistemas de culturas mais produtivos e menos impactantes.

### **Objetivos:**

#### **Geral:**

Verificar o efeito alelopático de compostos extraídos da parte aérea de *Urochloa ruziziensis* sobre soja transgênica cv. M-SOY 7908 RR e sua relação com a dessecação com glyphosate.

#### **Específicos:**

- Avaliar a atividade geral (citotóxica) dos extratos brutos extraídos da parte aérea de *Urochloa ruziziensis* com e sem aplicação do herbicida glyphosate;
- Isolar e identificar compostos alelopáticos majoritários e/ou bioativos da parte aérea da *Urochloa ruziziensis*;
- Avaliar a atividade citotóxica e fitotóxica do composto majoritário, extraído da *Urochloa ruziziensis* em plântulas de soja.

- Avaliar a possível relação entre a atividade e a precipitação pluvial, através de materiais coletados em distintas épocas após a aplicação do glyphosate.

## Material e Métodos

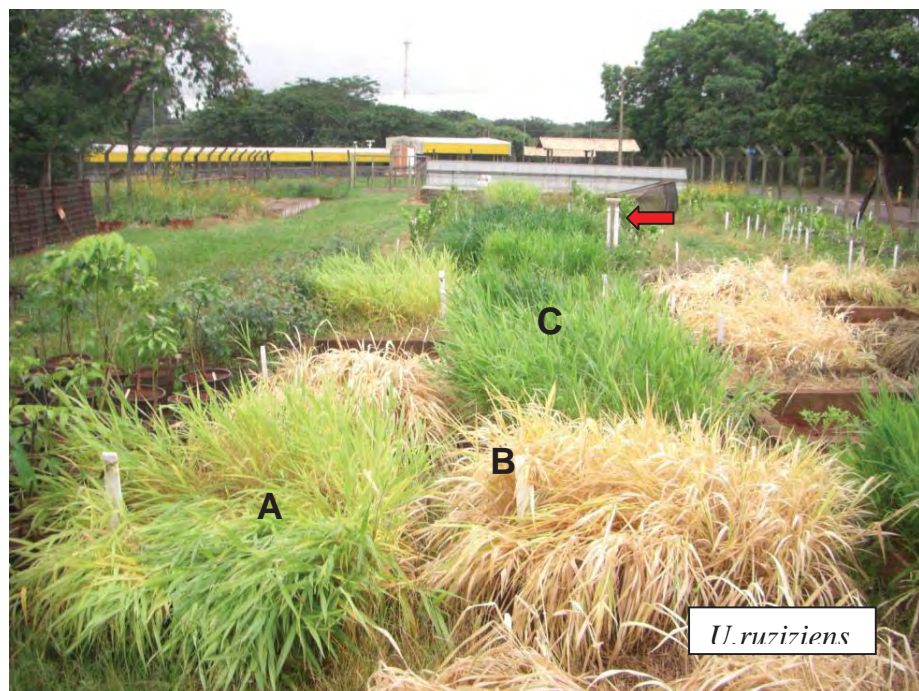
### Obtenção do material vegetal

Plantas de *Urochloa ruzizensis* se desenvolveram na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP, em área experimental pertencente ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em molduras de alvenaria construídas sobre o solo, com área de 1,33 m<sup>2</sup>, as quais constituíram as parcelas. O substrato utilizado no preenchimento das parcelas foi Latossolo Vermelho eutrófico típico de textura argilosa (ANDRIOLI; CENTURION, 1999), apresentando as seguintes características químicas: pH (CaCl<sub>2</sub>) igual a 6,0 g; com MO de 39,00 mg dm<sup>-3</sup>, 40,0 mg dm<sup>-3</sup> de P (resina); e 5,5; 49,0; 31,0; 22; 85,5 e 107,0 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de K, Ca, Mg, H+Al, SB e T, respectivamente, e V de 80%. Em julho de 2008, aproximadamente duzentas sementes de *U. ruzizensis* foram jogadas a lanço e superficialmente incorporadas ao solo de seis destas parcelas. A adubação de semeadura também foi realizada a lanço com base em análise de solo e na necessidade nutricional da cultura, depositando-se o equivalente a 500 kg ha<sup>-1</sup> da formulação 04-14-08 por parcela. Foi realizada uma adubação de cobertura com o equivalente a 150 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio aos 45 dias após a emergência das plantas (DAE).

Quando as plantas de *Urochloa* iniciaram o florescimento, aos 120 DAE, com altura aproximada de 0,7 m, foi realizada a dessecação com o herbicida glyphosate (Figura 9) em quatro parcelas, reservando-se duas parcelas para a coleta do material vegetal sem aplicação do herbicida (testemunhas). Para a dessecação foram utilizados 1,44 kg ha<sup>-1</sup> de glyphosate, empregando-se para tanto um pulverizador costal de precisão, munido de barra com duas pontas de jato plano (TT 110.02), espaçados de 0,5 m, com consumo de calda equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup> à pressão constante de 2,24 kgf cm<sup>-2</sup>.

Aos 5 e 10 dias após a dessecação, foram coletadas manualmente de cada parcela as partes aéreas das plantas com o auxílio de uma tesoura de poda, sendo os materiais secos à sombra e à temperatura ambiente, até massa seca constante. Mesmo procedimento foi adotado para a testemunha sem aplicação do herbicida, cujo material ainda verde foi cortado manualmente e depois seco à sombra. No decorrer do período de dessecação dos materiais foi registrada a precipitação pluvial por meio de um pluviômetro instalado ao lado das parcelas.

Os materiais vegetais secos foram moídos em micro moinho tipo Willey, utilizando-se peneira de 60 “mesh” e, posteriormente, acondicionados em recipientes plásticos até serem utilizados para a extração dos compostos.



**Figura 9.** Detalhe das parcelas de *U. ruziziensis* aos 5 (A) e 10 (B) dias após a pulverização com glyphosate e testemunha sem aplicação (C). A seta indica a localização do pluviômetro.



### **Extração dos compostos da parte aérea de *Urochloa ruziziensis***

O procedimento para a extração dos compostos da parte aérea de *U. ruziziensis* foi realizado em duas etapas junto ao Grupo de Alelopatia de Cádiz, no Departamento de Química Orgânica da Universidade de Cádiz, Espanha.

Inicialmente, em uma etapa preliminar, foram utilizadas 10 g de material moído das três épocas de controle de *Urochloa* (testemunha sem aplicação, 5 e 10 dias após a aplicação do glyphosate). Os materiais foram colocados em recipientes de vidro para a extração exaustiva e sucessiva, a frio, com solventes de polaridade crescente. Iniciou-se com a imersão do material em hexano, na proporção de 1:3 (p/v) sendo a mistura submetida ao ultrassom por 15 minutos em condições ambientais; este procedimento foi repetido três vezes. Terminado este procedimento, a fase líquida (sobrenadante) foi filtrada a vácuo, em papel Whatman nº 1 e concentrada sob pressão reduzida, utilizando-se evaporador rotativo (Büchi, modelo EL 131), repetindo-se essa operação por mais duas vezes, obtendo-se assim o extrato bruto em hexano. Na sequência, a fase sólida remanescente do hexano foi submetida à extração com diclorometano (DCM), repetindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. De maneira semelhante, a fase sólida remanescente do DCM foi submetida a extração com metanol (MeOH). Desta forma, ao final das extrações, foram obtidos três extratos brutos: hexano, DCM e MeOH. Os extratos de DCM e MeOH foram utilizados nos bioensaios de atividade geral e fitotoxicidade, excluindo-se o extrato de hexano, pois este foi utilizado no início da extração para a retirada de materiais graxos (ceras) do material.

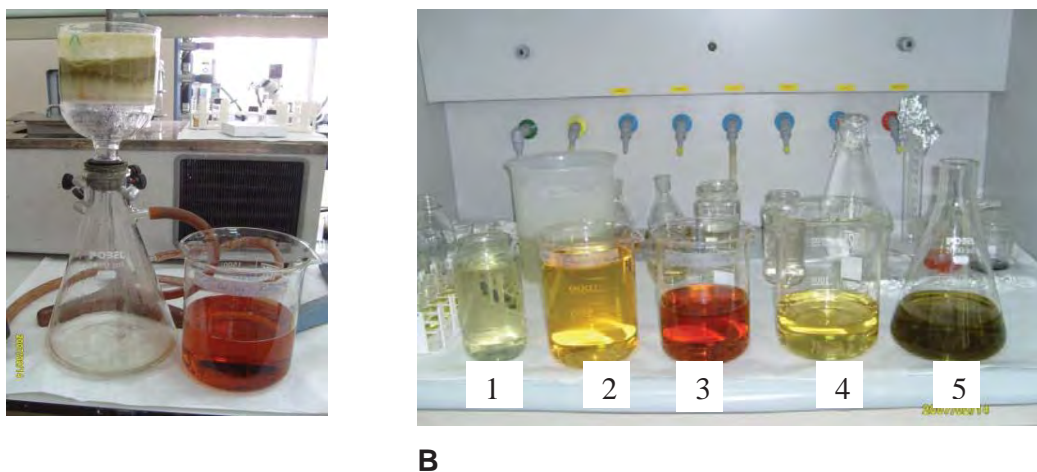
Terminados os bioensaios com os extratos brutos oriundos de 10 g de material moído de *Urochloa*, proveniente das três épocas de controle, numa segunda etapa foi realizada a extração em 0,3 kg em dois desses materiais selecionados de *Urochloa* (testemunha sem aplicação e 10 dias após a aplicação do glyphosate), para a qual se utilizou, primeiramente, como solventes o hexano e, na sequência, o DCM e o MeOH, utilizando as técnicas extrativas descritas anteriormente. O material de *Urochloa* com 5 dias após a aplicação do glyphosate não foi utilizado na segunda etapa da extração devido a grande semelhança dos resultados dos bioensaios com o do material com 10

dias após a aplicação do glyphosate. Nesta etapa, os extratos brutos de DCM e MeOH foram utilizados no bioensaio de atividade geral.

### Fracionamento do extrato bruto de MeOH

Devido aos melhores resultados obtidos com o extrato bruto metanólico no bioensaio de atividade geral, elegeu-se esse extrato para o fracionamento e o isolamento de compostos com possíveis atividades alelopáticas.

O extrato metanólico foi seco em evaporador rotativo a 40°C à vácuo (Büchi, modelo EL 131) até eliminação total do solvente. O sólido resultante, 12 g após a secagem, foi fracionado, extração de fase sólida (EFS) com sílica gel de fase reversa llichroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) (Figura 10A), utilizando-se como eluentes misturas de metanol/água nas proporções de H<sub>2</sub>O e MeOH (v/v) de 4:0; 3:1; 2:2; 1:3 e 0:4, sucessivamente, obtendo-se cinco frações, cada qual correspondendo à fase móvel utilizada (Figura 10B). Para cada mistura de solventes foi utilizado um volume de 2,0 L como eluente. Ao término da eluição, foi realizada a lavagem da coluna, passando 2,0 L de acetona para retirada das impurezas.



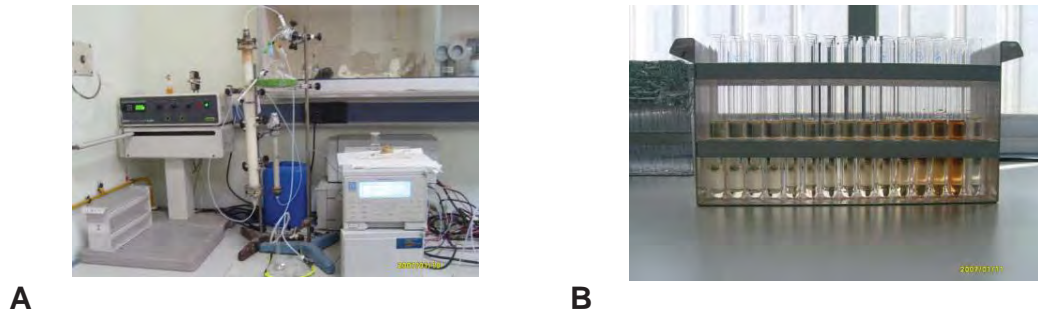
**Figura 10.** **A** - Separação das frações do extrato bruto de MeOH (12 g) utilizando cromatografia em coluna com llichroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ); **B**: da esquerda para a direita: 1 - extração com água destilada; 2 – metanol/água 1:3 (v/v); 3 – metanol/água 2:2 (v/v); 4 – metanol/água 3:1 (v/v); 5 – metanol.



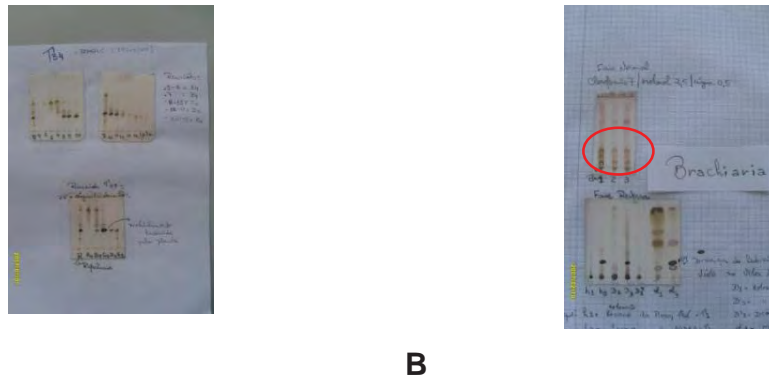
Foram realizados bioensaios de atividade geral para as cinco frações extraídas do extrato bruto de MeOH. As frações obtidas com as misturas água/metanol: 2:2 (fração A) e 3:1 (fração B), por serem as mais ativas, foram selecionadas para os fracionamentos em cromatografia líquida de média performance (MPLC) utilizando o aparelho Büchi, modelo B-685, com colunas de boro-silicato 3.3 (de 230 mm de comprimento quando a massa da amostra era até 150 mg, ou de 460 mm, quando a massa era de 150 a 300 mg), com um coletor de frações automatizado (Büchi, modelo B-684) com três suportes (“gradilhas”), cada qual contendo 60 tubos de ensaios com capacidade para 20 mL (Figura 11).

A fração A, com 3,0 g, foi particionada em porções de até 300 mg e fracionada mediante MPLC utilizando como fase móvel a mistura de água/acetona (3:2 v/v) em regime isocrático em uma coluna de 460 mm de comprimento, preenchida com Silicagel RP-18 como fase estacionária, em um fluxo de 2 mL/min do eluente e coleta de amostras nos tubos de ensaio a cada 6 min, no coletor de frações. Para a fração B, com 390 mg, foi utilizado o mesmo procedimento, porém com a coluna menor (230 mm) e porções de 50 mg e fluxo de 1ml/min, com tempo de coleta de 6 min e como fase móvel a mistura de água/acetona (2:3 v/v).

O fracionamento em MPLC foi monitorado mediante cromatografia em camada delgada (CCD), que consistiu nas reuniões dos tubos coletados seguindo os critérios de analogia ( $R_f$  - UV e visível - e coloração) apresentados em cromatofolhas (Cromatofolhas Merck AL TLC, sílica gel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S). Para a realização da CCD foram feitos pontos concentrados, dos tubos fracionados em MPLC, com o auxílio de tubos capilares, em placas (cromatofolhas) de 5x4cm. Foram feitos sete pontos por placa, a uma distância de 0,5 cm da borda inferior. As placas foram postas em câmara cromatográfica, usando como eluente misturas de água e acetona na proporção de 3:2 (v/v). Depois de secas, as placas foram postas sob luz ultravioleta (254 e 360 nm), marcando-se as manchas fluorescentes e/ou coloridas e, na sequência, reveladas (Figura 12). Para revelação foi utilizado “óleum”, uma mistura de ácido sulfúrico, água e ácido acético (1:4:20 v/v/v), com posterior aquecimento a 150°C.



**Figura 11.** Detalhe do aparelho MPLC (A) e da “gradilha” (B) contendo os tubos de coleta.



**Figura 12.** Detalhes de duas placas cromatográficas de camada delgada (CCD): representando a fração MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2(v/v) após reuniões do MPLC (A) e cromatografia das três épocas de colheita (referenciadas pela elipse vermelha) de *U. ruzizensis* (B).

### Identificação dos compostos de *U. ruzizensis*

Depois de realizado o isolamento e a purificação dos compostos, por meio de CC + CCD + MPLC ou por meio de CC + CCD + MPLC + HPLC, estes foram submetidos à identificação pela técnica de ressonância magnética nuclear mono e bidimensional e espectro de massa (EM). Os resultados dos espectros, quanto à identificação dos compostos isolados, encontram-se no final da tese (Anexos XX).

Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN foram obtidos em um aparelho Varian, Unity 400 e 600 MHz, utilizando como solvente piridina. Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  (ppm) e as constantes de acoplamento em Hz. Os valores de  $\delta$  foram referenciados em função do pico residual da piridina para próton  $\delta 7.55$  ppm e em função do pico central da piridina para carbono a  $\delta 135.5$  ppm.

## **Bioensaios**

### **Bioensaio de atividade geral (citotoxicidade)**

Este bioensaio foi inicialmente desenvolvido para avaliar a atividade de auxinas como reguladoras de crescimento (Hancock et al., 1964). Baseia-se no fato de que tecidos indiferenciados de vegetais podem se desenvolver em um tampão biológico com as concentrações do composto a ser estudado. Desta forma, o fundamento deste ensaio está em se determinar a inibição ou a estimulação da divisão celular de tecidos vegetais indiferenciados (comprimento diferenciado). O bioensaio de atividade geral, conhecido como bioensaio dos coleótilos estiolados de trigo, foi adaptado pelo professor Cutler em 1984 para detectar atividades farmacológicas em produtos químicos e o emprego deste bioensaio para estudos alelopáticos foi otimizado por Castellano (2002).

Este bioensaio permite avaliar um amplo espectro de atividades biológicas de forma sensível, econômica e rápida (24 horas). Permite discriminar entre produtos ativos e não ativos, e se utiliza para selecionar os compostos mais ativos de uma determinada coleção, que posteriormente serão submetidos a bioensaios mais específicos. No presente estudo, ele foi utilizado para avaliar a atividade dos extratos brutos (DCM e MeOH), das frações isoladas e dos produtos puros .

Para sua realização, sementes de trigo do cultivar Cortex foram postas para germinar em placas de Petri de 140 mm de diâmetro, sobre papel de filtro Whatman nº 1, que foram acondicionadas na câmara de germinação (Memmert, modelo ICE 700), em condições de obscuridade e a 22°C. Foram postas cerca de 100 sementes por

placa, umedecidas com um volume de 15 mL de água destilada e deionizada (Millipore Mili-Q).

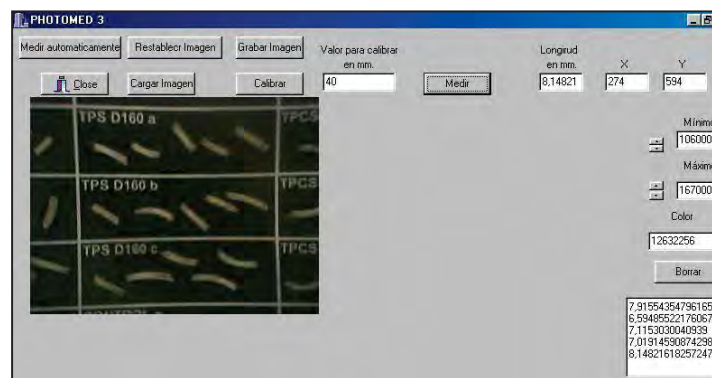
Decorridas 72 horas, foram cortados, sob luz verde e com o auxílio de uma guilhotina desenhada para isso, fragmentos de coleótilos de 4 mm de comprimento, extraídos da seção imediatamente posterior aos dois primeiros milímetros do epicótilo; com isso se seleciona a região de maior capacidade de crescimento celular.

Os fragmentos foram incubados por uma hora, sob as mesmas condições de germinação, em tampão citrato/fosfato pH 5,6, complementado com sacarose a 2%. Após a incubação, cinco coleótilos foram transferidos para tubos de ensaio com capacidade para 10 mL, contendo 2 mL do mesmo tampão adicionado da substância a ser estudada (extratos, frações ou produtos puros).

Os extratos e as frações foram testados nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm. Para o preparo das soluções a serem testadas, 9,6 mg do extrato seco (ou da fração) foram dissolvidos em 60  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO), quando necessário com o emprego de ultrassom (Selecta – P). Na sequência, esse volume foi resuspendido para 12,0 mL com tampão citrato/fosfato pH 5,6 acrescido de 2% de sacarose, homogeneizado e repartido para três tubos (2 mL/tubo). Cada tubo representou uma repetição, montando-se três repetições por tratamento. Os 6,0 mL restantes foram resuspendidos novamente para 12,0 mL e repartido para três tubos, diluindo, desta forma, a concentração original de 800 ppm em 50%. Este procedimento foi repetido mais uma vez, obtendo-se assim a concentração final de 200 ppm (em cada diluição realizada foram acrescidos 30  $\mu$ L de DMSO). Como controles, também em três repetições, foi utilizada solução tampão pura acrescida do solvente utilizado para dissolver os extratos – DMSO) e solução tampão contendo herbicida de referência – Logran Extra (terbutrina + triasulfurom), em concentrações decrescentes (800, 400 e 200 ppm).

Na seqüência, os tubos com os coleótilos foram postos para incubação em agitação constante (6 rpm) em um agitador de cultura (Stuart Scientif – Bibby, modelo SC2 ), também em condições de obscuridade e sob 22°C, por 24 horas.

Terminado o período de incubação, os fragmentos foram retirados dos tubos e postos sobre uma planilha plastificada contendo as identificações dos tratamentos e repetições, onde foram fotografados com uma câmara digital (WebCam - Creative) e posteriormente mensurados com o auxílio do programa Photomed® (Figura 13). Este programa, especialmente desenvolvido para o Grupo de Alelopatia de Cádiz, analisa as imagens digitalizadas de cada amostra e permite captar a medida do comprimento dos coleótilos independentemente da forma que estes adotam ao final do período de incubação, que depois são processados na planilha de cálculo Microsoft Excel.



**Figura 13.** Detalhe da janela do programa Photomed® com a ilustração dos fragmentos de coleótilos de trigo a serem mensurados.

### Bioensaio de fitotoxicidade

O bioensaio de fitotoxicidade consiste no segundo nível de estudo para os extratos, frações ou compostos, e oferece informação mais específica que o anterior. Neste bioensaio, procura-se reproduzir as condições naturais de ação dos produtos sobre as sementes e, por isso, os compostos são ministrados em solução aquosa. A seleção das espécies vegetais para este tipo de bioensaio foi realizada por meio de um amplo estudo desenvolvido por Macias et al. (2000), no qual propuseram cinco espécies alvos [*Lepidium sativum* (berro), *Lactuca sativa* (alface), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Allium cepa* (cebola) e *Triticum aestivum* (trigo)], as quais foram escolhidas

como modelos representantes dos grupos taxonômicos mais importantes, tanto de eudicotiledôneas como de monocotiledôneas

O bioensaio de fitotoxicidade consiste, basicamente, no estudo dos efeitos das soluções de interesse sobre a germinação das sementes e do crescimento inicial de plântulas das espécies alvo (cultivadas ou daninhas). A otimização deste bioensaio, como seleção das espécies receptoras, número de sementes por placa, período e condições de germinação, volume de solução, etc., também foi realizada por Castellano (2002). No presente estudo ele foi empregado para avaliar a atividade do extrato bruto de MeOH.

Os parâmetros que se avaliam são as percentagens de sementes germinadas por placa, o comprimento da raiz e o do caule. Para fins comparativos, acrescenta-se um herbicida comercial (Logran<sup>®</sup>) usado como padrão interno, com atividade inibitória conhecida.

Para a realização deste bioensaio, sementes das espécies alvo foram postas sobre papel Whatman n<sup>o</sup> 1 (acondicionados em placas de Petri com 3,0 cm de diâmetro) e umedecidas com 1,0 mL da solução teste tamponada (tampão de ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfônico – MES, 10 mM, com pH ajustado para 6,0). A solução teste foi previamente caracterizada quanto o pH (Crison, modelo micropH 2001, com eletrodo combinado Ingold). Como controle foi utilizada a solução tampão pura. Foram depositadas 20 sementes por placa de três espécies alvo, a saber: alface (*Lactuca sativa* L. cv. Teresa), cebola (*Allium cepa* L. cv. Valencia tardia) e tomate (*Solanum lycopersicum* Will. cv. Três cantos) com quatro repetições. Cada placa correspondeu a uma repetição.

Após a semeadura, as placas de Petri foram vedadas hermeticamente com Parafilm<sup>®</sup> e acondicionadas na câmara de germinação regulada para 25°C, em condição de obscuridade, onde foram mantidas por períodos que variaram com a espécie, a saber: tomate – 5 dias, alface – 6 dias, cebola – 7 dias. Ao término destes períodos, as placas foram transferidas para um congelador, onde permaneceram por no mínimo 24 h, para evitar o crescimento das plântulas e posteriormente favorecer a manipulação destas durante o processo de medida.

Para medir o comprimento do hipocótilo e das raízes, as placas foram retiradas do congelador, as plântulas descongeladas foram esticadas sobre um filme plástico adaptado sobre a mesa digitalizadora do Fitomed<sup>®</sup> (Figura 14) e, com o auxílio de uma caneta ótica, foram determinados os comprimentos.



A

B

**Figura 14.** Detalhe do computador (A) acoplado à mesa digitalizadora do Fitomed<sup>®</sup>, com as plântulas a serem medidas (B).

O Fitomed<sup>®</sup> é um sistema automatizado e informatizado de aquisição de dados especialmente desenvolvido para o Grupo de Alelopatia de Cádiz, sendo que o processamento dos dados (tratamento estatístico e representação gráfica) é feito mediante vínculo com a planilha de cálculo Microsoft Excel. Este sistema permite economia de tempo nas determinações associada ao aumento na precisão das medidas. O programa fornece concomitante aos resultados de comprimento, o percentual de germinação. Os valores obtidos para cada um dos parâmetros considerados se comparam com o “branco” em que se utiliza água destilada e deionizada tamponada com MES.

### **Otimização do bioensaio de fitotoxicidade para plântulas de soja**

Visando atingir os objetivos propostos, se fez necessária a otimização do bioensaio de fitotoxicidade, adequando-o para o estudo da atividade de substâncias sobre plântulas de soja. No presente estudo, ele foi utilizado para avaliar a atividade



dos extratos brutos de DCM e MeOH, da fração isolada em metanol/água 1;1(v/v), do produto puro majoritário extraído da fração A e dos comerciais (glyphosate, ácidos cis e trans aconítico e o cumárico). A inclusão dos bioensaios com os produtos comerciais se fez necessária para dirimir dúvida quanto a uma possível participação do glyphosate nos efeitos inibitórios até então observados e também para auxiliar na identificação dos produtos puros, uma vez que os ácidos cis e trans aconítico e o-cumárico foram relatados como produtos químicos com atividade alelopática comprovada em soja (VOLL et al., 2010).

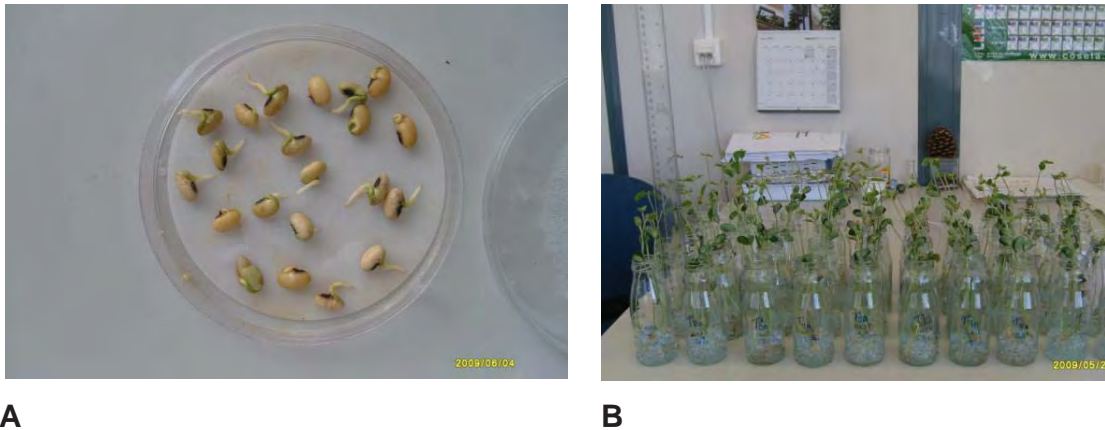
Para o bioensaio foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max*) da cultivar M-SOY 7908 RR pré-germinadas. Para tanto, as sementes foram postas para germinar em placas Gerbox de 100 cm<sup>2</sup>, sobre papel de germinação, que foram acondicionadas na câmara de germinação (Memmert, modelo ICP 800) regulada para 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Foram postas cerca de 30 sementes por placa, umedecidas com um volume de 12 mL de água destilada.

Decorridos quatro dias após a semeadura, quando iniciou a germinação, com o aparecimento da raiz primária (radícula) de mais ou menos 4 mm de comprimento, quatro sementes (pré-germinadas) foram transferidas para recipientes de vidro com capacidade para 0,5 L (9 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento) contendo 0,1 L de perlita. A perlita atuou como um suporte físico para o desenvolvimento das raízes das plantas, permitindo simultaneamente a aeração destas (Figura 8).

Os extratos e frações foram colocados nos recipientes nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm. Para o produto majoritário foram utilizadas as concentrações de 1,0; 5,0; 10; 50; 100; 500 e 1000 µM em um primeiro experimento e concentrações de 16; 32; 80; 120; 160; 240 e 320 µM em um segundo experimento. Para fins comparativos, foram testadas as concentrações de glyphosate em 1,0; 5,0; 10; 50; 100; 500 e 1000 µM. Para os produtos comerciais (ácidos cis e trans aconítico e o-cumárico) foram utilizadas as concentrações de 100; 500 e 1000 µM. Em todos os bioensaios foram adicionados 20 mL de solução em cada recipiente, com as devidas concentrações, em quatro repetições, com uma testemunha, que correspondeu a adições de mesmo volume de tampão MES.



Sete dias após a transferência das sementes de soja pré-germinadas para os recipientes, foram determinados nas plântulas o comprimento da parte aérea (CPA), o comprimento da raiz principal (CRZ) considerando a raiz primária como referência de medida, a massa seca das raízes (MSR) e a massa seca da parte aérea (MSPA).



**Figura 15.** Detalhe das placas de petri com sementes de soja pré-germinadas (A) e recipientes de vidro dos bioensaios de fitotoxicidade em plântula de soja, com perlita como substrato (B).

### Processamento de dados – Tratamento estatístico

Para o bioensaio de atividade geral (citotoxicidade), o experimento se fez com oito repetições (duas séries de quatro) obtendo-se a média total e o desvio padrão das amostras. O nível de atividade se expressa como porcentagem de incremento do comprimento na amostra do ensaio ( $\Delta P$ ) em relação ao incremento do comprimento do controle ( $\Delta C$ ), segundo a expressão:

$$[(\Delta P - \Delta C)/\Delta C] \times 100\%$$

Os resultados se refletem em um gráfico de barras em que o “zero” representa a população do controle - testemunha. Os valores positivos, em relação ao “zero”, indicam estimulação do parâmetro medido e os negativos, inibição dos mesmos.

Nos bioensaios de fitotoxicidade os parâmetros avaliados são as percentagens das sementes germinadas por placa, o comprimento da raiz e do caule. Para a germinação a distribuição da variável é o número de sementes germinadas por placa. Para a raiz e o caule, a distribuição utiliza as medidas de cada variável em cada placa, conhecida como distribuição média. Para estimar as médias e a variância, previamente em cada placa se agrupam as medidas em distribuições de frequências.

O uso da distribuição de médias garante as condições de normalidade e variâncias iguais para realizar o teste de contraste de hipóteses paramétricas. Isto permite contrastar a hipótese se as médias procedem de populações distintas ou iguais. Ou seja, compara bioensaios frente ao “branco”.

O suporte informático FITOMED<sup>®</sup> permite o cálculo deste contraste, fornecendo mais informações sobre o teste recomendável a ser utilizado sugerindo neste caso o teste paramétrico de Mann-Whitney. Desta maneira, é obtido um valor de probabilidade que permite, com um grau de confiança superior a 99%, entre 99 e 95% e menor de 95% assegurar que a diferença entre “brancos” e produtos é realmente significativa, isto é, que os produtos têm atividade.

Os resultados também se expressam em forma de incrementos percentuais em relação ao “branco” e se refletem em gráficos de barras. O valor “zero” representa a população controle. Qualquer valor positivo implicará em estimulação do parâmetro medido e os negativos em inibição.

Os resultados obtidos nos bioensaios com plântulas de soja foram submetidos à análise de variância pelo teste F, com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Estat v.2).

### **Cálculos dos valores de ID<sub>50</sub>**

Os cálculos dos valores de ID<sub>50</sub> (concentração necessária para alcançar 50% do efeito inibitório observado) no crescimento de coleóptilo e nos parâmetros das plântulas de soja (CPA, CR e MSR) foram submetidos à análise de regressão (MicroCal Origin v.

8) utilizando-se curvas sigmoidais (logística–dose resposta em farmacologia/química), sendo utilizadas as de ajustes melhores, segundo o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

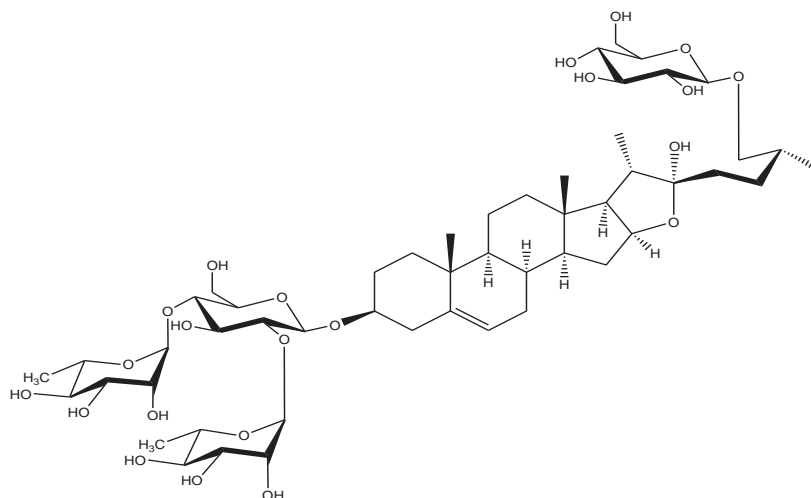
## Resultados e Discussão

Nesta pesquisa, ao longo do processo de extração, fracionamento e isolamento de substâncias químicas de *U. ruzizensis*, foram surgindo alguns indícios relevantes quanto à natureza química do produto majoritário extraído e testado em bioensaios de atividade geral (citotoxicidade) e de fitotoxicidade. Por exemplo, o fato dos extratos serem solúveis em água e, quando agitados, formarem espumas que persistiam por vários minutos, como também a ocorrência de fitointoxicação, com necrose acentuada, escurecimento e má formação, principalmente nas raízes das plântulas de soja.

A confirmação da natureza química da substância em maior concentração na *U. ruzizensis* ocorreu pela técnica de ressonância magnética nuclear mono e bidimensional (Anexos 1) e espectro de massa (EM= 1048 u.m.a.).

O composto majoritário encontrado na parte aérea de *U. ruzizensis* com atividade alelopática refere-se à substância química protodioscina (Figura 16), uma saponina esteroidal e este é seu primeiro relato em *U. ruzizensis*.

Os dados espectroscópicos deste composto coincidem com os descritos na bibliografia por De Combarieu et al. (2003) para a protodioscina isolada da planta de *Tribulus terrestris*.



**Figura 16.** Fórmula estrutural da protodioscina isolada de *Urochloa ruzizensis*.

As saponinas são compostos biosintetizados por enorme variedade de plantas. São produzidas no metabolismo secundário e, apesar de não serem essenciais para a vida da planta produtora, garantem vantagens para sua sobrevivência no ecossistema a que pertence (SANTOS, 2000).

As saponinas possuem uma estrutura anfipática formada por resíduos hidrofílicos de açúcares ligados a uma aglicona hidrofóbica. Essa aglicona é composta de átomos de carbono organizados em forma de anéis e denominada de sapogenina (CHANDEL; RASGOTI, 1980; LACAILLE-DUBOIS et al., 1996). A parte polar das saponinas é formada por açúcares como a glicose, galactose, arabinose, ramnose, xilose e ácido glicurônico, entre outros. Em geral, os açúcares estão na forma de oligossacarídeos distribuídos em cadeias lineares ou ramificadas, embora os monossacarídeos também possam ocorrer. O número de moléculas de açúcares mais freqüente, nesses compostos, varia de 3 a 5. Os mono e oligossacarídeos podem se ligar às agliconas através, tanto de ligação do tipo éter, como do tipo éster (MAHATO et al., 1988).

Quanto ao número de cadeias de açúcares presentes na molécula, as saponinas podem ser classificadas em monodesmosídicas e bidesmosídicas. As monodesmosídicas apresentam apenas uma cadeia de açúcar ligada à aglicona. As bidesmosídicas são saponinas que apresentam, além de uma cadeia de açúcar ligada à

aglicona no carbono 3, uma segunda cadeia de açúcares ligada ao carbono 28 (MAHATO et al., 1988).

A diferença na polaridade dos elementos que compõem a molécula das saponinas é responsável pela capacidade das mesmas em reduzir a tensão superficial da água levando à formação de espuma, quando em solução aquosa. A capacidade das saponinas de interagir com esteróis, presentes na membrana plasmática de eritrócitos, aumenta a permeabilidade dessa membrana, o que permite a entrada de íons e água para o interior das células resultando na ruptura das mesmas e liberação de hemoglobina (KARABALIEV; KOICHEV, 2003).

Apesar das propriedades tensoativa e hemolítica serem características marcantes das saponinas, elas não são comuns a todas às saponinas e, portanto, não podem ser usadas para definir esse grupo de compostos. Uma definição estrutural da aglicona desses compostos é a melhor maneira para defini-las (BRUNETON, 1999).

De acordo com a estrutura de suas agliconas, as saponinas podem ser classificadas em esteroidais e triterpênicas. As saponinas esteroidais são compostos que possuem 27 átomos de carbono no esqueleto da aglicona, geralmente distribuídos em seis anéis, e que apresentam grande semelhança estrutural com as saponinas triterpênicas. A diferença entre as mesmas é que a conformação do epoxi esqualeno, para a biossíntese das agliconas esteroidais, é de cadeira-barco-cadeira e não de cadeira-cadeira-cadeira como ocorre na biossíntese das agliconas triterpênicas (LACAILLE-DUBOIS et al., 1996)

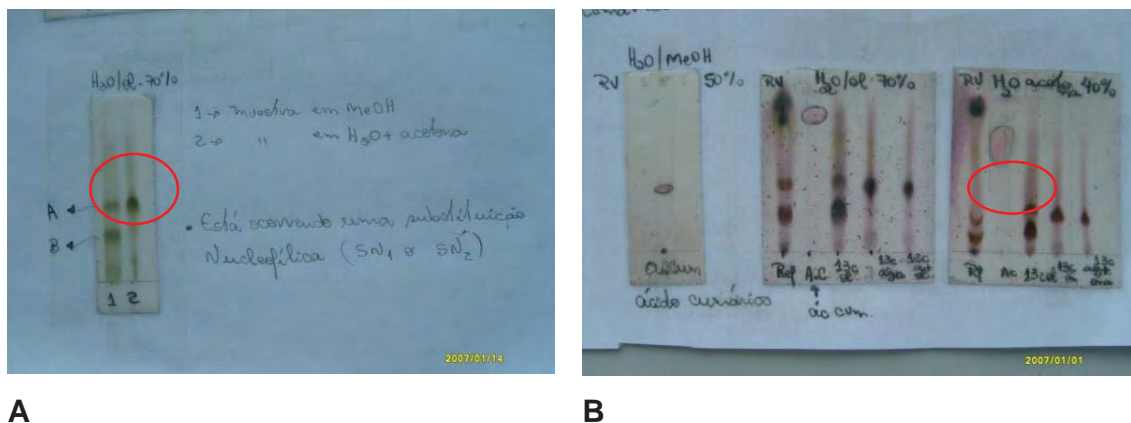
A protodioscina, uma saponina esteroidal, é um glicosídeo com núcleo tipo furostanólico; no gênero *Urochloa* foi isolada pela primeira vez por Haraguchi et al. (2003) das folhas de *U. decumbens*. Ela difere da dicotomina, uma saponina esteroidal isolada anteriormente de *Panicum dichotomiflorum*, pela ausência de uma unidade de ramnose. A dicotomina é descrita como responsável por surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos na Nova Zelândia (MUNDAY et al., 1993).

Durante o processo de isolamento dos produtos da *U. ruziziensis* foi observada reação de metilação quando se utilizava o metanol como solvente (Figura 17). Segundo Shao et al. (1997), o solvente metanol quando utilizado na extração de produtos de

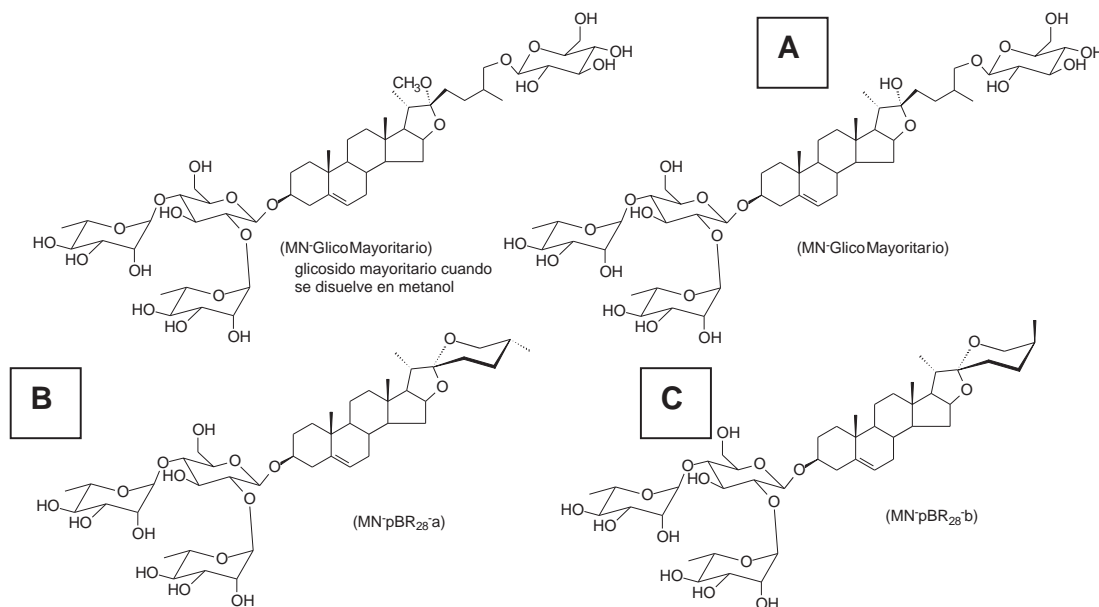
materiais vegetais, pode, na presença de protodioscina, desencadear uma reação de metilação da molécula; com isso, a protodioscina se transforma em metil protodioscina.

Protodioscina e metil protodioscina são saponinas esteroidais. Na década de 1950 descobriram-se plantas que apresentavam altos teores de saponinas esteroidais. As plantas portadoras dessas saponinas são todas Liliopsida (monocotiledôneas), principalmente das famílias Agavaceae, Dioscoreaceae, Poaceae e Smilacaceae.

Nesta pesquisa foram isolados e também identificados, pela primeira vez em *U. ruzizensis*, uma mescla de dois outros glicosídeos (Anexos 2), cujas estruturas químicas encontram-se na Figura 18 e estão codificados como MN-pBR28\*a (Figura 18A) e MN-pBR28\*b (Figura 18C). Ao comparar com a literatura, foram identificados como saponinas esteroidais derivadas da bioconversão microbiana da metil-protodioscina por *Penicillium melinii* (HE et al., 2006).



**Figura 17.** Representação por cromatografia líquida delgada (CCD) da ocorrência de metilação da fração MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2 (v/v) (A) e da presença de ácido cumárico (B), ambas destacadas com as elipses.



**Figura 18.** Estruturas químicas dos três compostos isolados e identificados de *U. ruziziensis*: A (protodioscina), B (MN pBR<sub>28</sub>\*a) e C (MNpBR<sub>28</sub>\*b).

Na realização do fracionamento para isolamento dos produtos bioativos nos dois materiais de *Urochloa* (T1, que foi cortado verde e depois seco à sombra em lugar coberto, e T3 coletado no campo 10 dias após a aplicação de glyphosate), observou-se que o material verde possuía o dobro da quantidade do glicosídeo majoritário (próximo a 3,0 g) quando comparado à quantidade do material com 10 dias de aplicação (1,4g). Esta diferença na quantidade do mesmo glicosídeo entre os dois materiais de mesma espécie, após os fracionamentos, provavelmente, está relacionada com quantidade de chuvas ocorrida neste período nos dois materiais, pois neste intervalo de 10 dias, compreendido entre a dessecação de T3 e a coleta dos dois materiais choveu 39,2 mm. A chuva contínua pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação. Sabe-se que isto se aplica à plantas produtoras de glicosídeos, alcalóides e até mesmo de óleos voláteis (EVANS, 1996; WATERMAN e MOLE, 1994). Provavelmente, deve-se a isso a recomendação de vários pesquisadores para se esperar um intervalo de alguns dias entre a dessecação da *Urochloa* e a semeadura da soja para que não ocorra fitotoxicidade e perda na produção desta.



Barbosa-Ferreira et al. (2009), avaliando as variações das concentrações de saponinas relacionadas com a maturação das folhas de *U. brizantha*, deduziram que as folhas secas (mortas) continham quantidades de saponinas quatro vezes menores quando comparado a folhas verdes (vivas).

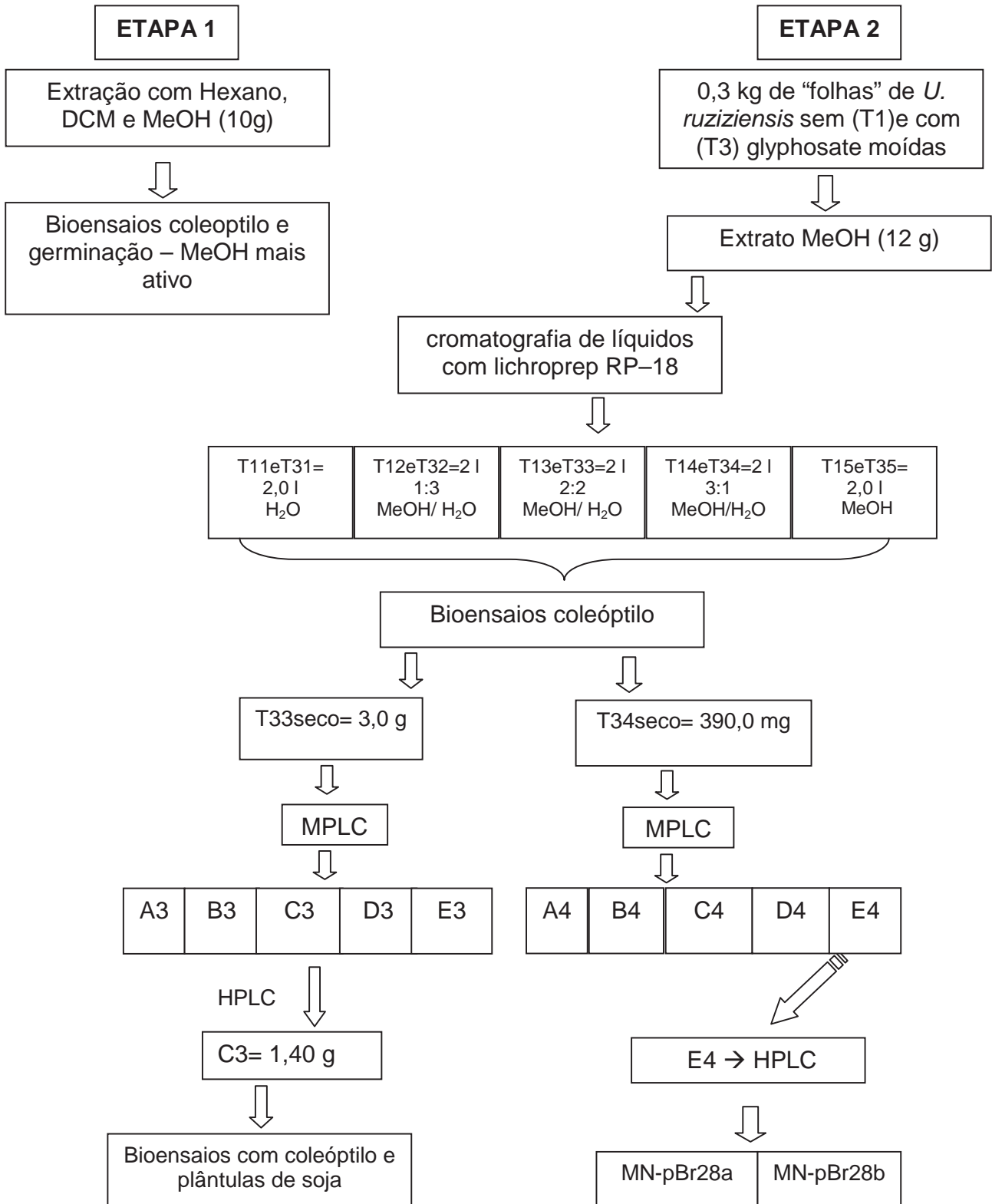
Um estudo feito por MEAGHER et al. (1996) com *Panicum* sp. e *U. decumbens* mostra que os níveis de saponinas e sapogeninas podem variar entre as espécies e dentro da mesma espécie, de acordo com a idade da planta e o local de colheita. Observações semelhantes foram feitas por FLAØYEN et al. (2004) que avaliaram a concentração de sapogeninas em amostras de *Nartheicum ossifragum* e elas variaram entre os locais, ao longo de uma estação do ano e, possivelmente, entre as plantas. Além disso, a concentração de saponinas em plantas pode variar, também, com estresses ambientais e fase do ciclo de vida (OLESZEK, 2002).

Trabalhando com quantificação de saponinas em pastagens de *Urochloa*, Brum (2006) observou que as menores concentrações de saponinas nas plantas de *U. decumbens* e *U. brizantha* ocorreram nos meses de julho a setembro, e estão relacionadas com o período de menor precipitação pluvial do ano (estação seca) e que neste período as pastagens encontravam-se muito secas. Brum et al. (2009), avaliando a concentração de saponinas em cultivares de *U. decumbens* e *U. brizantha* nas distintas fases do ciclo de vida das plantas, encontraram que a fase que apresentou maior concentração da protodioscina foi a de queda das sementes, ou seja, fase final do ciclo de vida, na qual foram observados teores de 2,09% e 1,94 % para *U. brizantha* e *U. decumbens*, respectivamente.

Desta forma, pode-se inferir que os sintomas de amarelecimento das plântulas frequentemente relatados no campo, com redução no crescimento e diminuição da produção da soja quando a sua semeadura é realizada imediatamente após a dessecação de *U. ruziziensis* estão relacionados, principalmente, com o efeito alelopático da gramínea sobre a cultura da soja. A magnitude deste efeito é dependente da concentração da protodioscina disponível na solução do solo, que por sua vez é dependente da quantidade de precipitação pluvial ocorrida neste período.



No fluxograma (Figura 19) são representadas as etapas de isolamento e purificação do material da parte aérea de *U. ruzizensis*, com e sem aplicação de glyphosate, que possibilitou a identificação de três glicosídeos. Cada fase do processo foi acompanhada com bioensaios de atividade geral e, posteriormente, bioensaio de fitotoxicidade com plântula de soja, para identificar em qual etapa do processo de fracionamento se encontrava o produto com atividade alelopática.

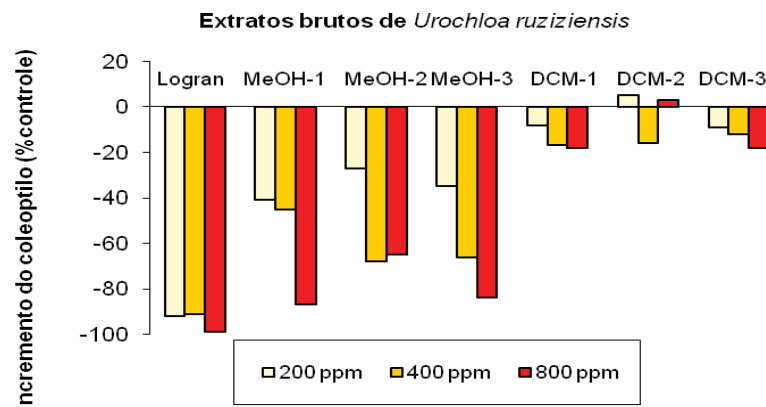


**Figura 19.** Resumo do processo utilizado para isolamento dos compostos da *U. ruziziensis* com e sem glyphosate.

### Atividade alelopática

Comparando-se os efeitos dos extratos brutos de DCM e MeOH da parte aérea de *U. ruziziensis* sobre o crescimento dos coleóptilos de trigo foi verificado que a substância alelopática encontrava-se no extrato bruto metanólico (Figura 20). Pode-se ainda observar que os extratos brutos metanólicos MeOH-1, MeOH-2 e MeOH-3, que corresponderam, respectivamente, a *Urochloa* coletada sem e com herbicida glyphosate aos 5 e 10 dias após a aplicação, foram os que apresentaram o maior efeito inibitório, com redução no incremento do crescimento do coleóptilo, em média 60%, na concentração de 400 ppm.

Nos extratos brutos de MeOH, para os três materiais de *U. ruziziensis* avaliados, nota-se certa proporcionalidade entre as concentrações ministradas e os efeitos inibitórios manifestados no crescimento do coleóptilo, atingindo, em média, 40%, 60% e 80% de inibição a 200, 400 e 800 ppm, respectivamente.



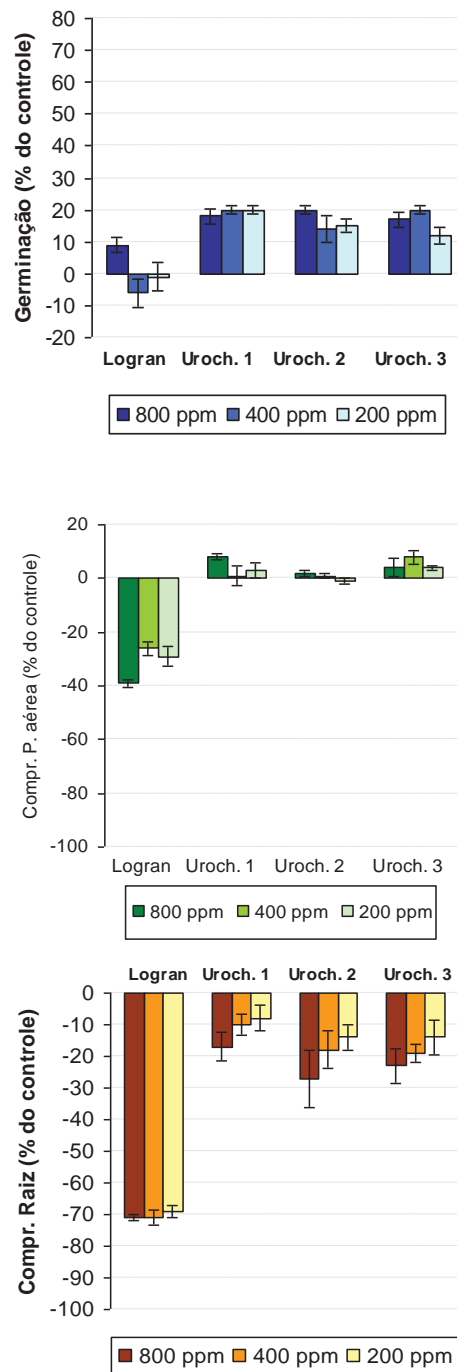
**Figura 20.** Efeito dos extratos brutos de MeOH e de DCM de *U. ruziziensis*, coletada em três épocas (1-sem glyphosate; 2-com 5 dias após a aplicação do glyphosate e 3-com 10 dias após o glyphosate), sobre o crescimento de coleóptilo de trigo, comparado ao Logran, o herbicida de referência.

A semelhança entre os resultados encontrados quanto à inibição do crescimento do coleóptilo de trigo com extrato bruto de MeOH com e sem aplicação do glyphosate evidenciaram que a presença ou ausência do herbicida, nas três épocas avaliadas, não foi um fator relevante na atividade alelopática manifestada neste bioensaio e, provavelmente, é a *U. ruzizensis* que detém em sua constituição química substâncias capazes de inibir o crescimento do coleóptilo.

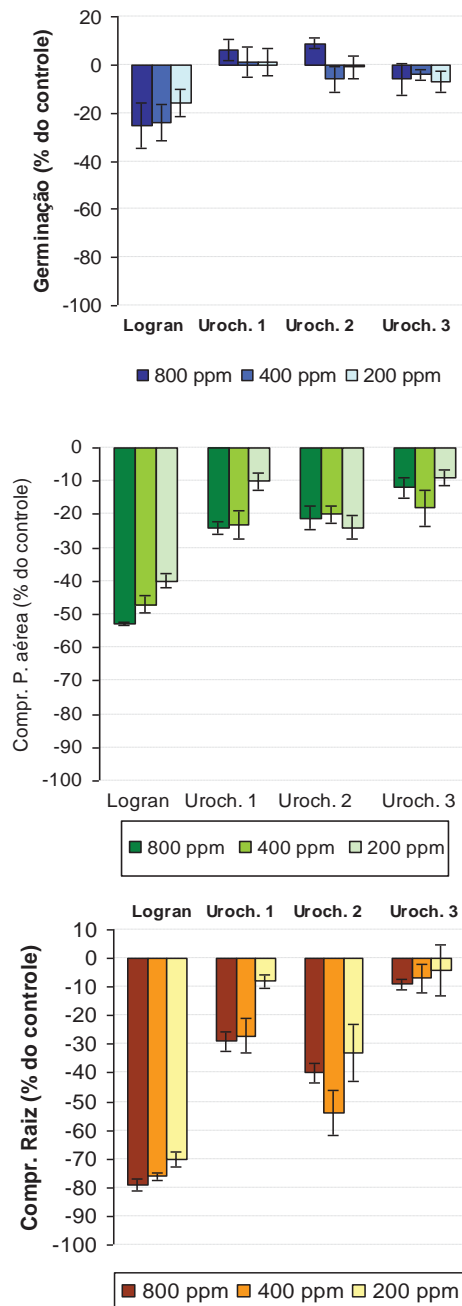
A suspeita da inexistência de atividade alelopática inibitória decorrente do glyphosate em plântulas de soja transgênica foi reforçada com os resultados adquiridos ao longo do processo de fracionamento, isolamento e identificação de compostos de *U. ruzizensis*, com os respectivos bioensaios de atividade geral e fitotoxicidade. Velini et al. (2008), expondo plantas de soja transgênica à sub-doses de 0; 1,8; 3,6; 7,2; 18; 36; 72; 180; 360 e 720 g de e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate, não constataram acúmulo de ácido chiquímico, confirmando a resistência da planta ao herbicida.

Resultados obtidos com os bioensaios de fitotoxicidade utilizando-se os extratos brutos de MeOH-1, MeOH-2 e MeOH-3 em sementes de alface, tomate e cebola estão representados, respectivamente, nas Figuras 21 a 23.

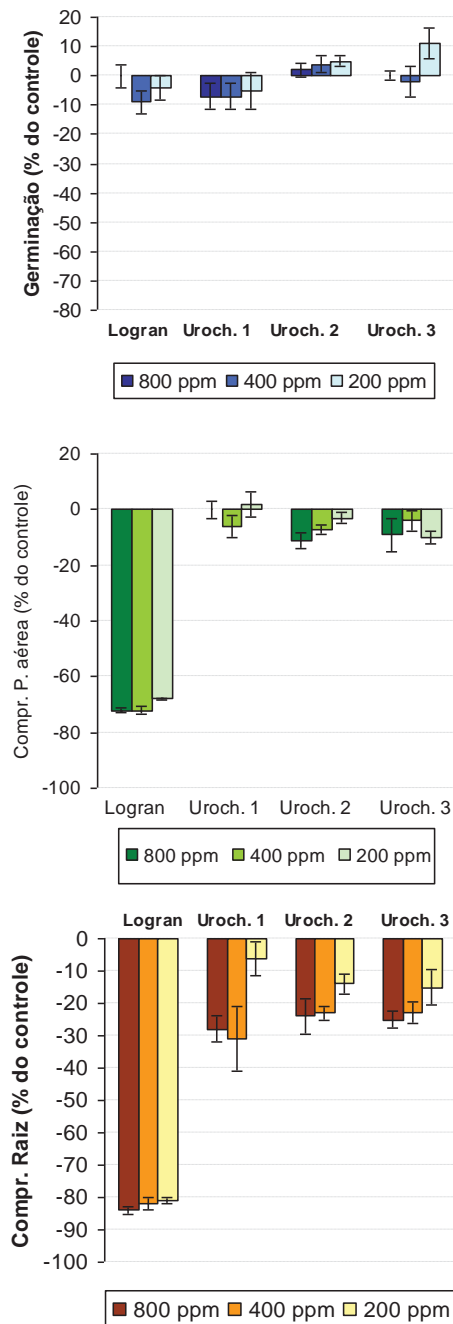
De maneira geral, os efeitos inibitórios sobre as espécies utilizadas nos bioensaios manifestaram-se, principalmente, no comprimento da parte aérea nas plântulas de tomate (Figura 22), em média de 28% e no comprimento das raízes, sendo mais acentuado nas plântulas de tomate e cebola, reduzindo o crescimento em 30%, em média (Figura 23).



**Figura 21.** Porcentagem da germinação, do comprimento da parte aérea e das raízes de alfafa, em relação ao controle, em concentrações (ppm) dos extratos brutos de MeOH extraído de *U. ruziziensis*. Sendo que Uroch. 1, 2 e 3 correspondem, respectivamente, a *U. ruziziensis* sem glyphosate e com este aos 5 e 10 dias após a aplicação (DAA). Logran<sup>®</sup> é um herbicida padrão.



**Figura 22** Porcentagem da germinação, do comprimento da parte aérea e das raízes de tomate, em relação ao controle, em concentrações (ppm) dos extratos brutos de MeOH extraído de *U. ruziziensis*. Sendo que Uroch. 1, 2 e 3 correspondem, respectivamente, a *U. ruziziensis* sem glyphosate e com este aos 5 e 10 dias após a aplicação (DAA). Logran<sup>®</sup> é um herbicida padrão.



**Figura 23.** Porcentagem da germinação, do comprimento da parte aérea e das raízes de cebola, em relação ao controle, em concentrações (ppm) dos extratos brutos de MeOH extraído de *U. ruziziensis*. Sendo que Uroch. 1, 2 e 3 correspondem, respectivamente, a *U. ruziziensis* sem glyphosate e com este aos 5 e 10 dias após a aplicação (DAA). Logran<sup>®</sup> é um herbicida padrão.



Após os bioensaios de atividade geral e de fitotoxicidade em alface, tomate e cebola, realizou-se um bioensaio de fitotoxicidade em plântulas de soja com os extratos de DCM e MeOH da *Urochloa* sem glyphosate. Os resultados de comprimento da parte aérea (CPA) e de raízes (CRZ) e massa seca da parte aérea (MSPA) e de raízes (MSR) das plântulas de soja encontram-se na Tabela 8 e Figura 24.

Mesmo não apresentando significância nos resultados, o extrato bruto de DCM promoveu um incremento nos parâmetros da soja avaliados, notadamente na concentração de 200 ppm (Tabela 8). Em contrapartida, para o extrato bruto de MeOH os resultados foram significativamente inibitórios com 400 ppm, para comprimento de raízes da soja, e com 800 ppm, para comprimento da parte aérea, raízes e massa seca de raízes de soja.

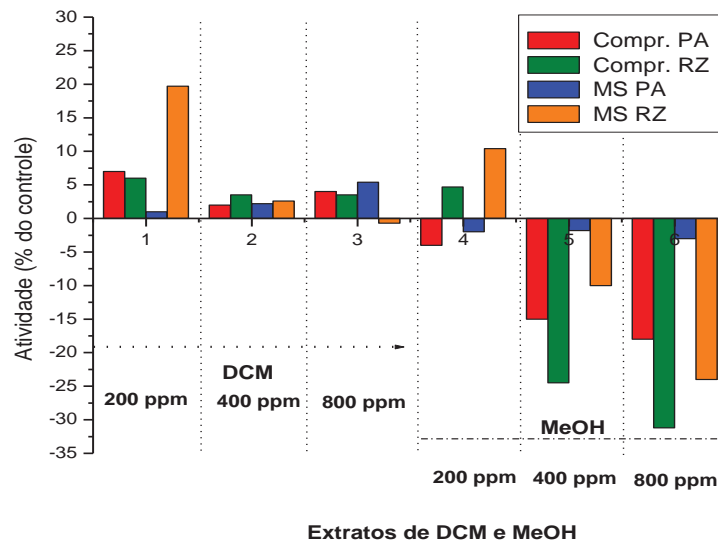
**Tabela 8.** Efeito alelopático do extrato bruto de diclorometano (DCM) e de metanol (MeOH), ambos extraídos da parte aérea de *U. ruziziensis* sem glyphosate, sobre o comprimento da parte aérea e das raízes e massa seca da parte aérea e das raízes (mg) de plântulas de soja M-SOY 7908 RR.

Extrato bruto	Comprimento (cm)		Massa seca (mg)	
	parte aérea	Raízes	parte aérea	raízes
Test. (MES)	18,38 ab	4,45 ab	639,17 a	53,20 ab
DCM - 200 ppm	19,63 a	4,73 a	639,83 a	63,67 a
DCM - 400 ppm	17,04 ab	4,37 ab	653,30 a	54,60 ab
DCM - 800 ppm	19,13 ab	4,60 a	673,70 a	52,87 ab
MeOH - 200 ppm	17,79 ab	4,66 a	630,10 a	58,77 ab
MeOH - 400 ppm	15,74 b	3,36 ab	632,67 a	48,37 ab
MeOH - 800 ppm	15,43 b	3,07 b	620,53 a	40,47 b
F	4,01*	4,64**	0,77 NS	2,74 NS
DMS	3,88	1,50	96,43	21,48
CV (%)	7,92	12,96	5,39	14,57

Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS – não significativo pelo teste F.

Analisando-se os resultados do bioensaio (Figura 24), observa-se que o extrato metanólico (MeOH) foi o mais inibitório quando comparado ao de DCM, proporcionando menor comprimento de parte aérea (15% em 400 ppm), de raízes (25 % em 400 ppm) e

de massa seca de raízes (25 % em 800 ppm) de plântulas de soja quando comparado à testemunha, mas sem afetar significativamente a massa seca da parte aérea das plântulas.

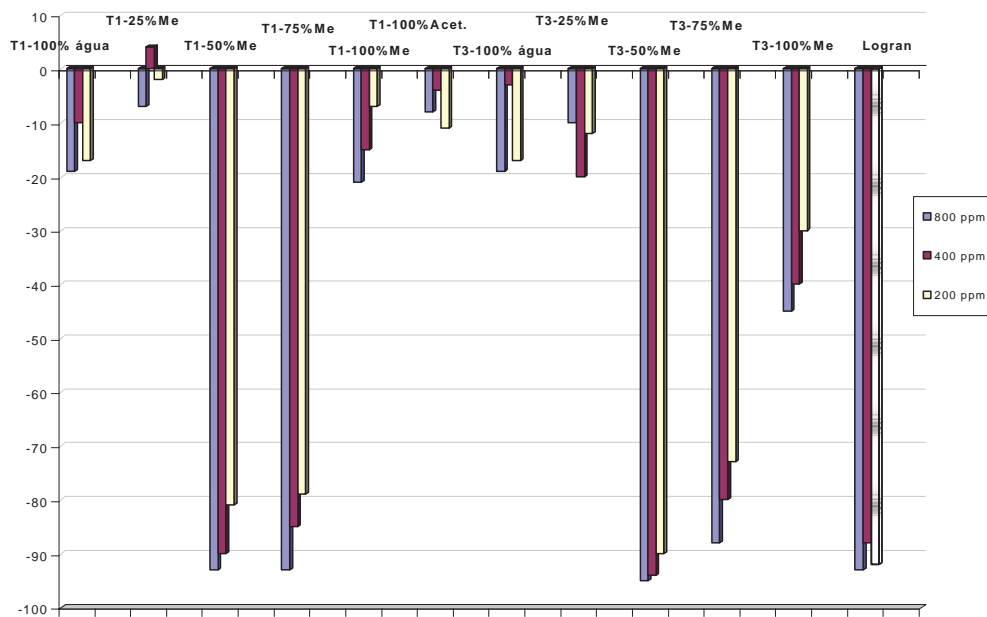


**Figura 24.** Efeito da concentração de extratos brutos de DCM e MeOH extraídos da parte aérea de *Urochloa* sobre o comprimento da parte aérea e raízes e massa seca de parte aérea e raízes de plântulas de soja M-SOY 7908 RR em relação ao controle (MES).

Após os resultados obtidos nos bioensaios com o extrato bruto metanólico, que demonstrou seu efeito inibitório, este foi selecionado para dar continuidade ao processo de fracionamento. Para o fracionamento foram utilizados dois materiais de *Urochloa*, sem glyphosate (T1) e com glyphosate (T3) coletado 10 dias após a aplicação. Cada material forneceu cinco frações com os eluentes metanol e água e uma fração extraída com acetona. As frações, doze no total, foram utilizadas em bioensaios de atividade geral, comparando-as com o herbicida Logran® (Figura 25).

Pôde-se observar que as frações extraídas com a mistura metanol/água 2:2 (v/v) (no gráfico, T1-50%Me e T3-50%Me) e metanol/água 3:1 (v/v) (no gráfico, T1-75%Me e

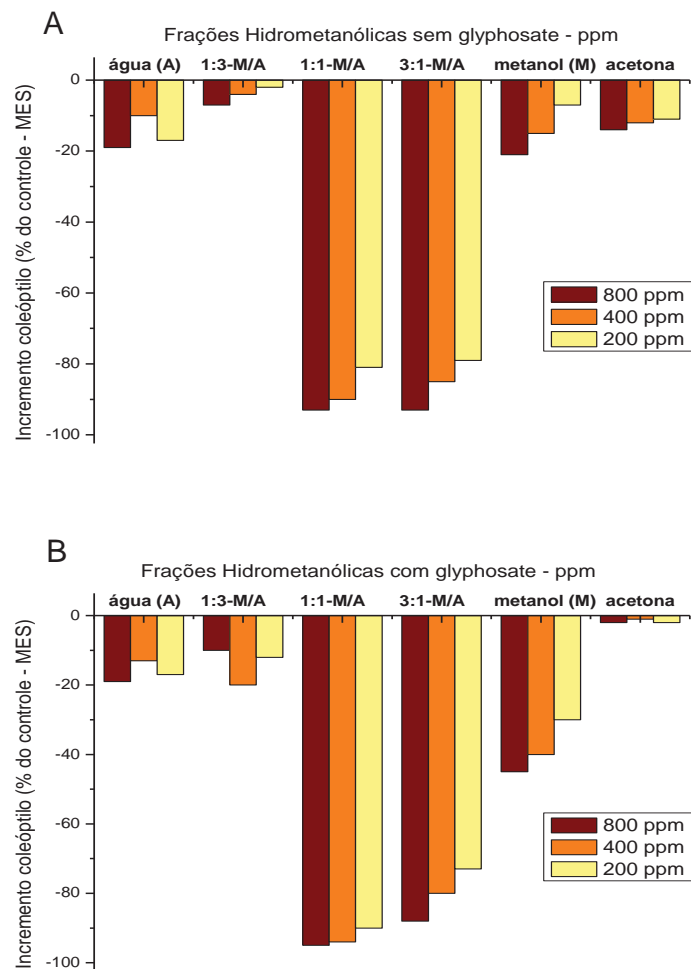
T3-75%Me) foram as mais inibitórias dentre as avaliadas, proporcionando menor incremento do comprimento do coleóptilo, mesmo na menor diluição, 200 ppm, (próximas a 80% de inibição). Para Macías et al. (2000), pesquisando efeito alelopático em folhas de girassol, um composto é considerado promissor quando apresentar bioatividade superior a 40% pelo menos a partir da concentração de 300 ppm.



**Figura 25.** Porcentagem de inibição do crescimento do coleóptilo de trigo, em relação ao controle, com frações extraídas do extrato bruto de MeOH após cromatografia de líquidos com lichroprep RP-18. T1 e T3 referem-se a *U. ruziziensis* sem e com glyphosate (10 DAA), respectivamente. Logran<sup>®</sup> é o herbicida padrão.

Para melhor visualização da bioatividade das frações, foram confeccionados gráficos individuais, por materiais sem e com glyphosate (Figura 26A e 26B, respectivamente). De maneira geral, quando se analisa a inibição do crescimento do coleóptilo de trigo nos materiais sem e com glyphosate, observa-se um comportamento

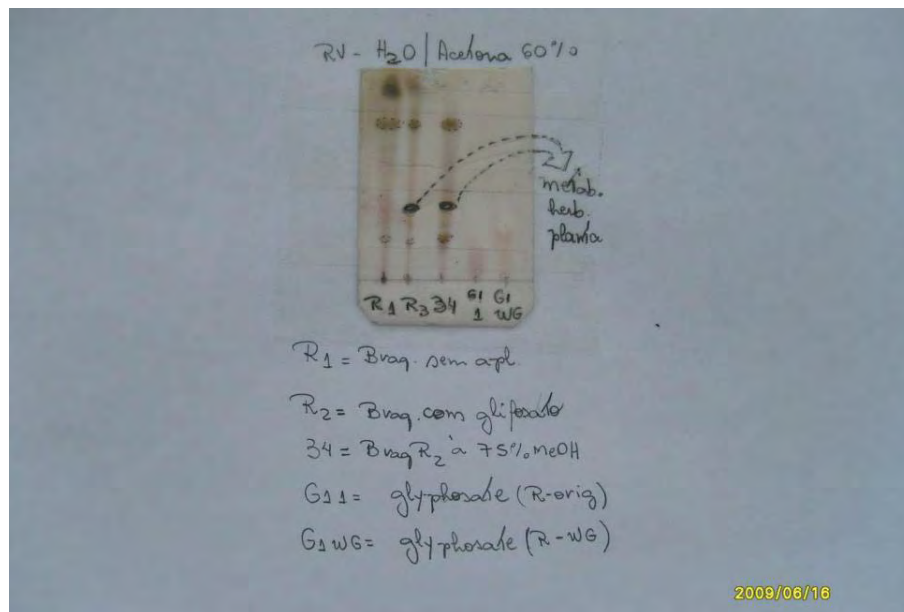
semelhante, principalmente nas frações hidrometanólicas 2:2 e 3:1 (v/v). Essa semelhança entre as duas épocas coletadas reforça a hipótese de que a atividade alelopática da *Urochloa* na soja está relacionada com a constituição química do material vegetal utilizado como cobertura vegetal e não à aplicação do glyphosate.



**Figura 26.** Porcentagem de inibição no crescimento do coleóptilo de trigo, em relação ao controle, com frações do extrato bruto de MeOH da parte aérea de *Urochloa* sem (A) e com glyphosate (B), em que M/A = MeOH/H<sub>2</sub>O.

Devido à semelhança dos resultados entre os dois materiais de *Urochloa* (sem e com glyphosate) observada nos bioensaios de atividade geral em coleótilo de trigo (Figura 26), elegeu-se o material com glyphosate para dar sequência ao isolamento das substâncias alelopáticas. A preferência por este material foi decorrente de observações feitas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) em fase reversa sob comprimento de onda no ultravioleta (360 nm): este diferiu do material sem glyphosate pela presença de uma mancha fluorescente (Figura 27). Provavelmente, essa mancha no extrato hidrometanólico de *Urochloa* tratada com glyphosate está relacionada com os adjuvantes que são adicionados à formulação do produto comercial, pois a molécula de glyphosate não possui grupos cromóforos para serem detectados neste comprimento de onda.

Por apresentarem a maior inibição do crescimento do coleótilo de trigo (acima de 80%) (Figura 26) as frações MeOH/água 2:2 (v/v) com 3,0 g, e MeOH/água 3:1 (v/v) com 390 mg foram selecionadas para o MPLC.



**Figura 27.** Representação por cromatografia líquida delgada (CCD) do material sem glyphosate (R1) e com glyphosate (R2) e 34 corresponde à fração MeOH/H<sub>2</sub>O 3:1 (v/v).

Para a cromatografia em MPLC utilizou-se como eluente, para a fração T33, a mistura acetona/água 1:1 (v/v), pois foi a que proporcionou melhor separação de compostos em placa de sílica de fase reversa (CCD – RP18 ou C-18). Para o processo do MPLC não foi utilizada a mistura MeOH/água devido a ocorrência de reação de metilação.

Nessa pesquisa, o ácido *o*-cumárico, um produto químico comercial que possui atividade alelopática comprovada, foi testado nos bioensaios de fitotoxicidade em plântulas de soja, assim como o ácido aconítico, nas formas *cis* e *trans*, para auxiliar na investigação de isolamento e identificação dos compostos da *U. ruziziensis*, uma vez que foram relatados efeitos alelopáticos desses compostos em soja (VOLL et al., 2010).

Os resultados observados para o efeito alelopático com a utilização do ácido aconítico (AA), nas formas *cis* e *trans* (Tabela 9), e para o ácido *o*-cumárico, nas concentrações de 100 µM, 500 µM e 1000 µM (Tabela 10), não foram significativos para as várias características avaliadas nas plântulas de soja.

**Tabela 9.** Efeito dos ácidos *cis* e *trans* aconítico (AA) sobre o comprimento da parte aérea e das raízes (cm) e massa seca da parte aérea e das raízes (mg) de plântulas de soja M-SOY 7908 RR.

Ácido aconítico (AA) Concentrações	Comprimento (cm)		Massa seca (mg)	
	parte aérea	raízes	parte aérea	Raízes
	Cis - trans	cis - trans	cis - trans	cis - trans
Test. (MES)*	19,96a - 19,96a	5,46a - 5,46a	592a - 592a	50,20a - 50,20a
10 <sup>-4</sup> M	20,34a - 21,72a	5,69a - 5,28a	568a - 599a	53,06a - 65,25a
5.10 <sup>-4</sup> M	22,80a - 19,13a	5,94a - 5,05a	570a - 628a	65,18a - 48,30a
10 <sup>-3</sup> M	21,66a - 18,88a	5,47a - 5,22a	555a - 592a	59,03a - 60,00a
F Trat.	1,54NS-1,17NS	0,56NS- 0,21NS	0,53NS- 0,50NS	3,32NS-2,67NS
DMS	4,38 - 4,99	1,26 - 1,56	88,68 - 102,96	15,33 - 20,69
CV (%)	9,83 - 11,94	10,69 - 14,17	12,84 - 8,13	12,84 - 17,62

Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS – não significativo pelo teste F.

MES\* - tampão.

Estes resultados discordam dos relatados por Voll et al. (2010), que observaram que o cultivo de soja em áreas que receberam o AA por meio da aplicação de vinhaça (resíduo da cana-de-açúcar) ou em áreas de pastagem de gramíneas, pode apresentar redução na germinação e menor desenvolvimento das raízes das plantas. Os autores alegam que fatores desfavoráveis, como a falta de umidade no solo, poderão comprometer o estabelecimento da cultivar de soja, sensível ao ácido aconítico nestas áreas. Uma explicação plausível para os resultados distintos encontrados nesta pesquisa quando comparados ao que se tem na literatura é que, provavelmente, a cultivar de soja M-SOY 7908 RR não foi sensível a estes ácidos ou que as doses dos ácidos utilizadas neste bioensaio foram inferiores às empregadas em outros trabalhos.

**Tabela 10.** Efeito do ácido *o*-cumárico no comprimento da parte aérea e das raízes (cm) e massa seca da parte aérea e das raízes (mg) de plântulas de soja M-SOY 7908 RR.

Ácido cumárico	Comprimento (cm)		Massa seca (mg)	
	parte aérea	Raízes	parte aérea	Raízes
Test. (MÊS)*	17,10 a	5,02 a	588,88 a	58,93 a
10 <sup>-3</sup> M	14,40 a	4,64 a	571,40 a	49,05 a
5.10 <sup>-4</sup> M	17,67 a	5,60 a	554,20 a	48,38 a
10 <sup>-4</sup> M	17,35 a	5,20 a	580,83 a	47,88 a
F	2,69 NS	2,48 NS	0,72 NS	3,26 NS
DMS	3,86	1,05	73,62	12,24
CV (%)	11,07	9,84	6,11	11,42

Test. (MES)\* - testemunha com a solução tampão pura.

Analisando-se os dados referentes ao bioensaio com as frações MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2 (v/v), provenientes dos dois materiais (T1 e T3 - *Urochloa* sem e com glyphosate, respectivamente), em quatro diluições: 800, 600, 400 e 200 ppm (Tabela 11), constatou-se que foi significativa a redução ocorrida nas plântulas de soja, notadamente no comprimento da parte aérea e na massa seca das raízes com 400, 600 e 800 ppm. A massa seca das raízes foi o parâmetro mais sensível quanto ao efeito inibitório, pois diferiu estatisticamente da testemunha (MES) em todas as diluições, exceto a 200 ppm.

**Tabela 11.** Efeito das frações extraídas em MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2 (v/v) de T13 (*Urochloa* sem glyphosate) e T33 (*Urochloa* com glyphosate) sobre o comprimento da parte aérea e das raízes (cm), e massa seca da parte aérea e das raízes (mg) de plântulas de soja.

Extrato MeOH/H <sub>2</sub> O (2:2)	Comprimento (cm)		Massa seca (mg)	
	parte aérea	Raízes	parte aérea	Raízes
Test. (MES)*	18,17 a	4,91 a	639,43 a	53,27 a
T13 - 200 ppm**	16,13 ab	4,06 b	598,50 a	41,47 abc
T13 - 400 ppm	13,06 bc	2,59 c	605,00 a	35,47 c
T13 - 600 ppm	11,69 c	2,31 c	599,00 a	33,25 c
T13 - 800 ppm	11,72 c	2,04 c	561,75 a	31,35 c
T33 - 200 ppm	18,06 a	4,03 b	589,75 a	51,72 ab
T33 - 400 ppm	14,20 bc	2,65 c	640,50 a	38,10 bc
T33 - 600 ppm	12,88 bc	2,30 c	614,25 a	37,35 c
T33 - 800 ppm	11,06 c	2,39 c	625,25 a	37,25 c
F	14,90**	37,42**	1,36 NS	7,01**
DMS	3,36	0,79	108,10	13,85
CV (%)	10,03	11,04	7,46	14,58

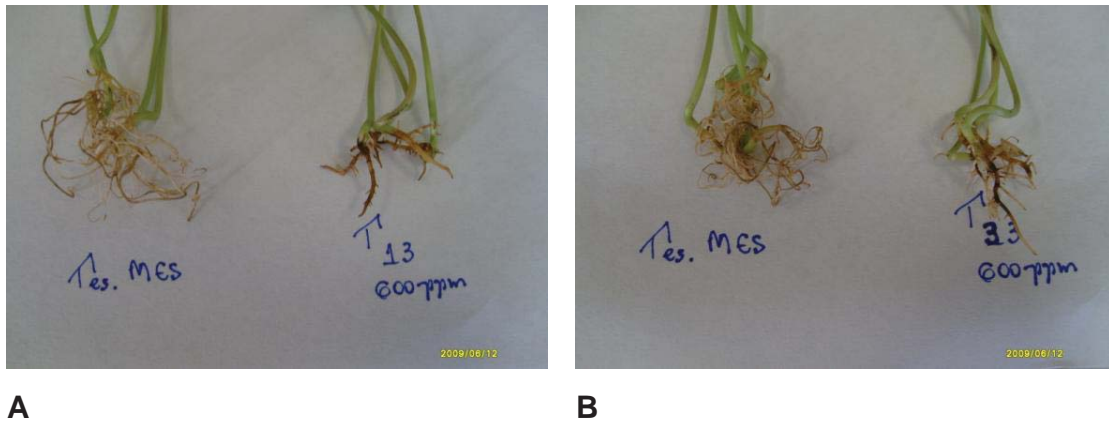
Médias seguidas por mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS – não significativo pelo teste F.

\* MES = Testemunha

ppm\*\* - Concentrações utilizadas em parte por milhão (ppm).

Na Figura 28 são observados, particularmente na concentração de 600 ppm da fração MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2 (v/v), sintomas de efeitos deletérios nas raízes das plântulas de soja quando comparadas com as da testemunha (MES). As raízes apresentam-se necrosadas, escuras, com poucas ramificações secundárias e pêlos radiculares. Estes sintomas visuais foram observados nas plântulas de soja tratadas com as frações hidrometanólicas dos dois materiais (sem e com glyphosate).

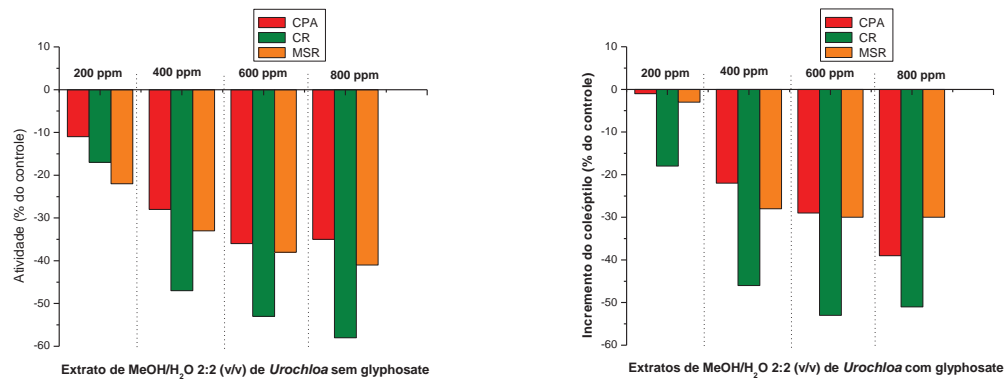




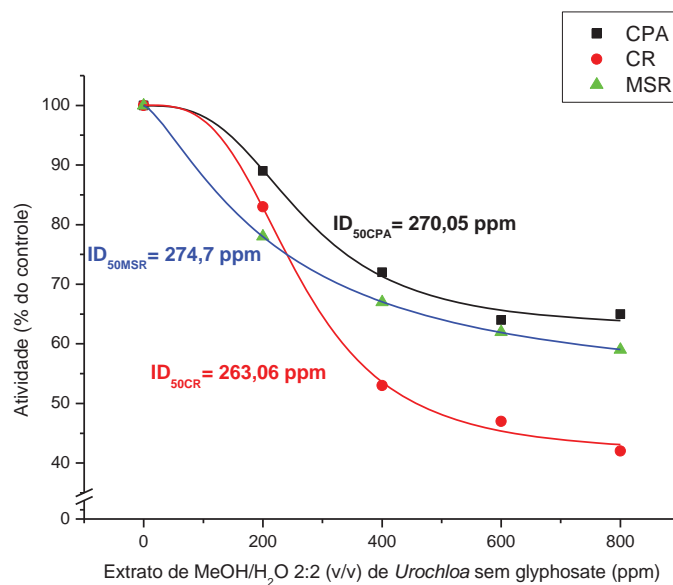
**Figura 28.** Detalhe das raízes de plântulas de soja sob concentração de 600 ppm da fração MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2 (v/v) da parte aérea de plantas de *U. ruzizensis* sem (A) e com (B) aplicação de glyphosate, em relação à testemunha (MES).

Para uma melhor visualização dos efeitos inibitórios ocorridos nas plântulas de soja dependentes da dose utilizada, foram apresentados os dois materiais, separadamente, sem e com glyphosate (Figura 29).

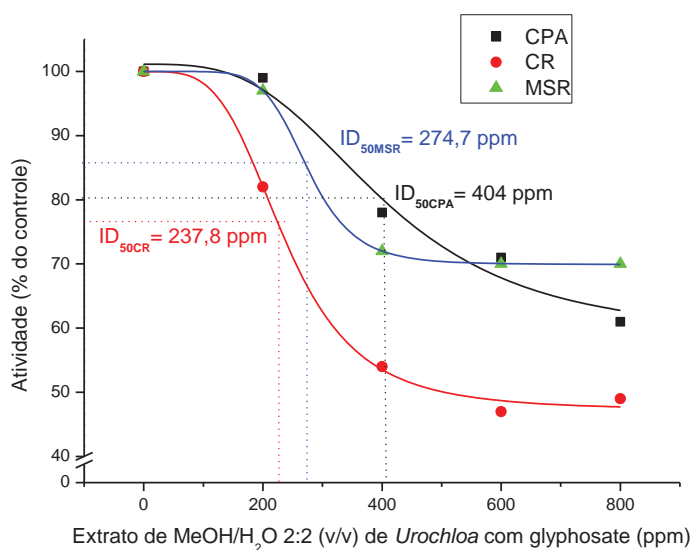
Submetendo os dados inibitório do crescimento das plântulas de soja (Figura 29) à análises de regressão para as características comprimento de parte aérea e de raiz e massa seca de raízes, em função da concentração do extrato de MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2 (v/v) de *U. ruzizensis* em duas épocas de coleta, sem glyphosate (Figura 30) e com este aplicado há dez dias (Figura 31), verificou-se que o efeito foi sigmoidal, permitindo estimar a dose inibitória 50 (ID<sub>50</sub>) em 270,1 ppm ( $R^2=0,9839$ ), 263,1 ppm ( $R^2=0,9933$ ) e 274,7 ppm ( $R^2=0,9999$ ), respectivamente, para o extrato sem glyphosate e para o extrato com glyphosate a dose inibitória 50 (ID<sub>50</sub>) encontrada foi de 404,0 ppm ( $R^2=0,9239$ ), 237,8 ppm ( $R^2=0,9911$ ) e 274,70 ppm ( $R^2=0,9999$ ), respectivamente.



**Figura 29.** Efeitos da concentração de extratos de MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2 (v/v) de *Urochloa* sem (A) e com glyphosate (B) sobre o comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz (CR) e massa seca de raízes (MSR) de plântulas de soja M-SOY 7908 RR.



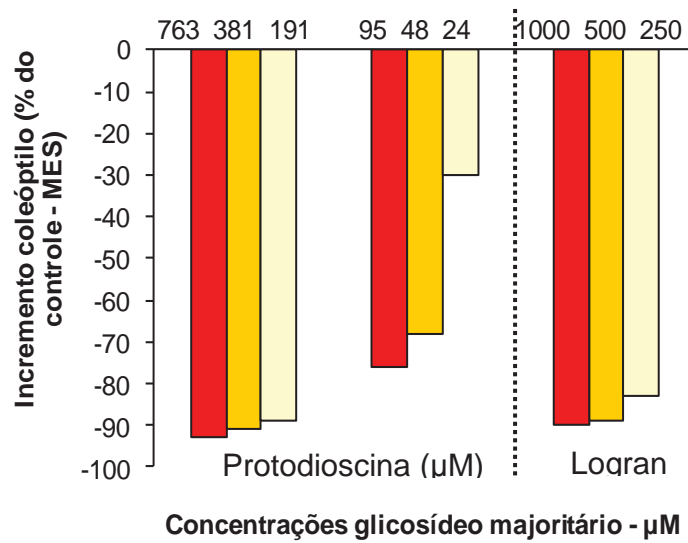
**Figura 30.** Curvas de dose-resposta do efeito do extrato de MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2 (v/v) de *U. ruziziensis* sem a aplicação de glyphosate, com os respectivos ID<sub>50</sub>, para o comprimento da parte aérea (CPA) e raiz (CR) e massa seca de raízes (MSR) de plântulas de soja M-SOY 7908 RR.



**Figura 31.** Curvas de dose-resposta do efeito do extrato de MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2 (v/v) de *U. ruziziensis* aos 10 dias após a aplicação de glyphosate para o comprimento da parte aérea (CPA) e raiz (CR) e massa seca de raízes (MSR) de plântulas de soja M-SOY 7908 RR.

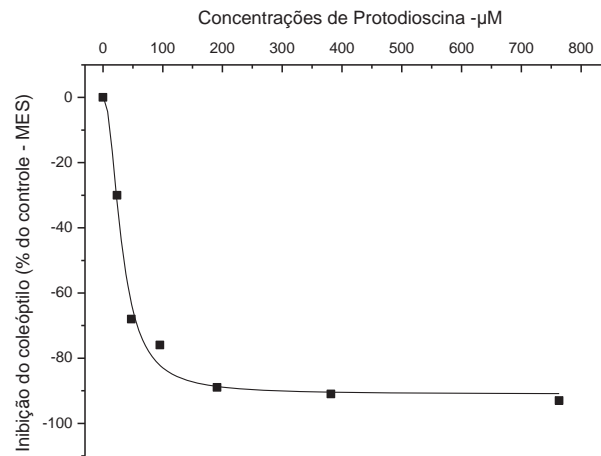
Após o MPLC e HPLC das frações MeOH/H<sub>2</sub>O 2:2 e 3:1 (v/v) de *U. ruziziensis*, o composto escolhido para dar continuidade ao estudo, embasado nos resultados dos bioensaios geral e de fitotoxicidade, foi o que se extraiu em maior quantidade e que foi identificado inicialmente como um glicosídeo majoritário (C3) e posteriormente confirmado como sendo protodioscina.

No bioensaio de citotoxicidade (Figura 32), no qual se utilizou a protodioscina isolada nas concentrações de 25,0; 48,0; 95,0; 191,0; 381,0; e 763,0  $\mu$ M, constatou-se efeito inibitório sobre o incremento do comprimento do coleóptilo de trigo, com reduções de 93% (763,0  $\mu$ M) à 30% (24,0  $\mu$ M). Observa-se que os valores de inibição mantiveram-se altos até a diluição de 48  $\mu$ M (68%), demonstrando que se trata de um produto com grande potencial alelopático.



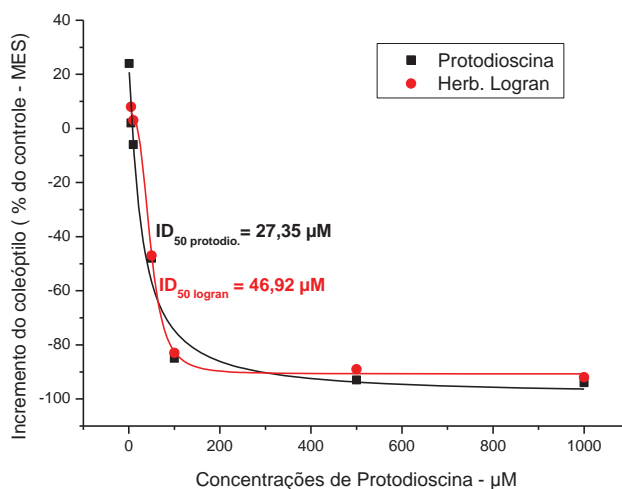
**Figura 32.** Porcentagem de inibição do crescimento do coleóptilo de trigo, sob concentrações crescentes de protodioscina, proveniente da fração T33, e de Logran<sup>®</sup>.

Neste bioensaio, submetendo os dados de inibição no crescimento do coleóptilo de trigo à análise de regressão (Figura 33), verificou-se que o efeito foi sigmoidal, permitindo estimar a dose inibitória 50 (ID<sub>50</sub>) de protodioscina próxima a 30,0 μM (R<sup>2</sup> = 0,9830).



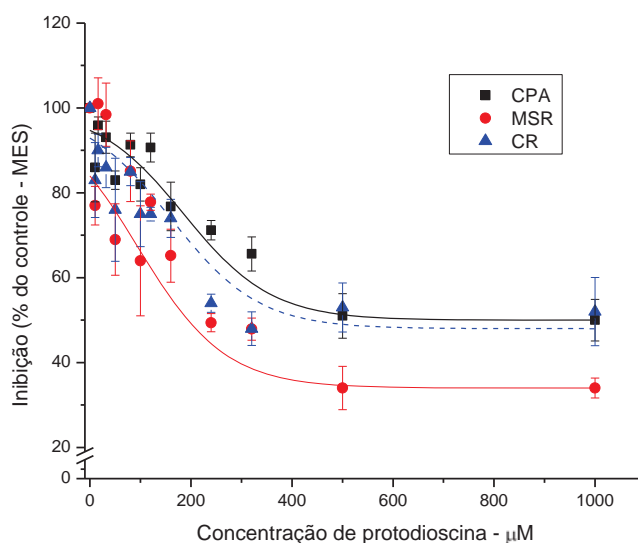
**Figura 33.** Porcentagem de inibição do crescimento do coleóptilo de trigo, sob concentrações crescentes de protodioscina proveniente da fração T33.

Outro bioensaio de atividade geral foi realizado com a protodioscina e o herbicida Logran<sup>®</sup> em coleóptilo de trigo utilizando as concentrações de 1,0; 5,0; 10; 50; 100; 500 e 1000 μM. Os resultados quanto à inibição do comprimento do coleóptilo de trigo foram submetidos à análises de regressão em função das concentrações dos dois produtos ministrados (Figura 34). Verificou-se que para o efeito inibitório produzido nos coleóptilo adequou-se uma curva sigmoideal, permitindo estimar a dose inibitória 50 (ID<sub>50</sub>) de 27,35 μM ( $R^2 = 0,9688$ ) e 46,92 μM ( $R^2 = 0,9966$ ) para protodioscina e o herbicida Logran<sup>®</sup>, respectivamente, o último utilizado como padrão de inibição.



**Figura 34.** Efeito das concentrações crescentes de protodioscina proveniente da fração T33 e do herbicida Logran<sup>®</sup> no comprimento do coleóptilo de trigo.

Foram realizados mais dois bioensaios de fitotoxicidade em plântulas de soja para testar o efeito alelopático de concentrações de protodioscina extraída de *U. ruziziensis*. As médias dos efeitos dos dois ensaios foram analisadas conjuntamente. Nas análises de regressão, nas quais foram submetidos os dados de comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz principal (CR) e a massa seca de raízes (MSR) das plântulas de soja em função da concentração de protodioscina (Figura 35), verificou-se que o efeito foi sigmoidal, permitindo estimar a dose inibitória 50 (ID<sub>50</sub>) da protodioscina em 186 µM ( $R^2=0,963$ ), 160 µM ( $R^2=0,937$ ) e 96,68 µM ( $R^2=0,877$ ), respectivamente.

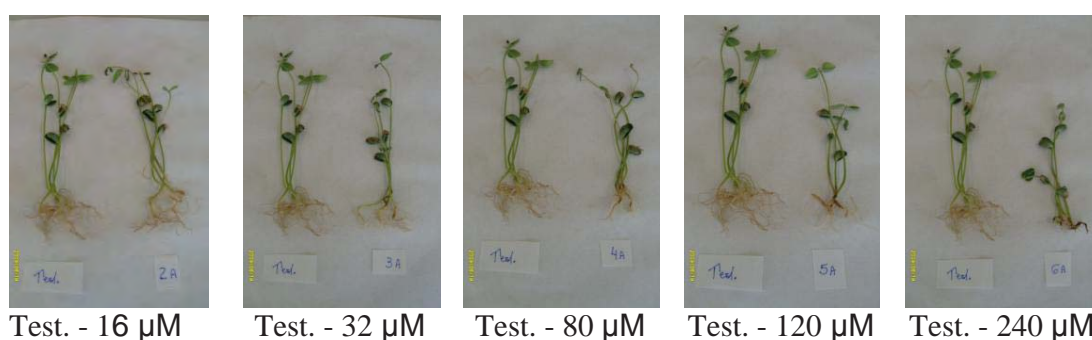


**Figura 35.** Curvas de dose-resposta de comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz principal (CR) e massa seca de raízes (MSR) de plântulas de soja M-SOY 7908 RR submetidas a concentrações de protodioscina. Barras nas curvas correspondem ao erro padrão das médias.

A fitointoxicação nas plântulas de soja, manifestadas principalmente nas raízes através de necroses (Figura 36) foi dependente da concentração de protodioscina. Com o aumento nas concentrações de protodioscina (16,0; 32,0; 80,0; 120,0 e 240,0 µM), observou-se, visualmente, (Figura 36), acentuada necrose na raiz principal, com forte escurecimento e redução do seu comprimento e má formação das raízes secundárias e também ocorreu redução no comprimento das plântulas. Provavelmente, essa fitointoxicação foi decorrente do efeito alelopático dessa substância no metabolismo celular da planta de soja.

Este efeito de fitointoxicação nas plântulas de soja pode ser decorrente de alterações ocorridas na membrana plasmática. Bonini et al. (2010), avaliando o efeito do extrato de *U. ruziziensis* sobre o metabolismo energético da soja, concluíram que o extrato de *U. ruziziensis* alterou a atividade respiratória do tecido integro das raízes e ativou enzimas oxidantes, o que pode estar relacionado a um estímulo de estresse

oxidativo, confirmando um efeito alelopático da *U. ruziziensis* sobre o metabolismo energético na soja. Nesta linha de pesquisa, Ferro et al. (2010), trabalhando com extrato butanólico de *U. ruziziensis* atuando na atividade respiratória de mitocôndrias de soja, concluíram que houve inibição da cadeia respiratória como um todo, sugerindo que o extrato butanólico de *U. ruziziensis* apresentou efeito alelopático sobre a soja, pois interferiu no metabolismo energético, afetando a respiração mitocondrial.



**Figura 36.** Plântulas de soja M-SOY 7908 RR desenvolvidas em soluções com concentrações crescentes de protodioscina. A testemunha (MES) = planta da esquerda.

Protodioscina e metil protodioscina foram extraídas de sementes de *Asparagus officinalis* por Shao et al. (1997) e utilizadas em bioensaios de atividade geral com células humanas leukemia HL-60 e foram testadas em DNA, RNA e na síntese protéica. Os resultados mostraram que os efeitos inibitórios no DNA, RNA e síntese protéica foram mais intensos com o aumento da dose utilizada, e que a protodioscina apresentou efeito inibitório mais acentuado, nas três variáveis analisadas, do que a metil protodioscina, com dose letal ( $DL_{50}$ ) no DNA de 9,0 µM. Para a metil protodioscina foram necessários 19 µM. Quando compararam a intensidade do efeito inibitório nas três variáveis estudadas, os autores encontraram que esta foi maior no DNA, intermediário no RNA e mais atenuado na síntese protéica. Devido ao melhor resultado apresentado pela protodioscina, os autores a selecionaram para bioensaios complementares para testar a solubilidade dessa substância e também avaliar se os



efeitos inibitórios poderiam ser reversíveis no DNA. Os resultados comprovaram que a protodioscina é hidrossolúvel e que os efeitos inibitórios no DNA foram irreversíveis.

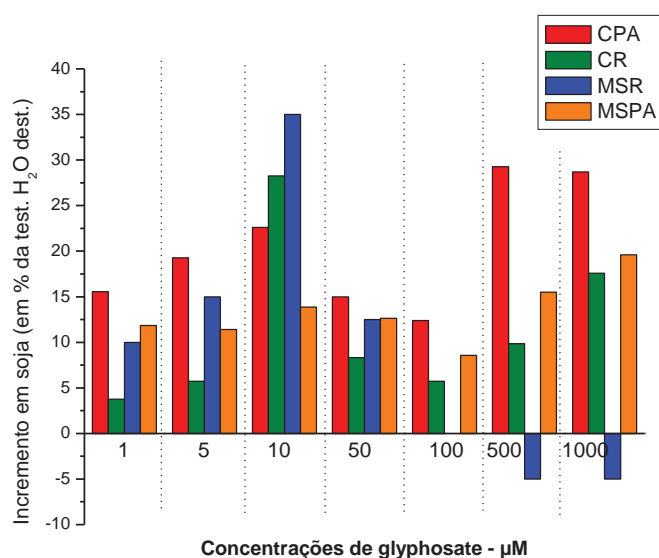
A substância metil protodioscina tem propriedades antitumorais (Liu et al., 2005). Essa substância, em células K562 (cancerígena), induziu a uma alteração bifásica, ou seja, causou uma hiperpolarização precoce seguida de despolarização do potencial da membrana mitocondrial. O efeito inicial observado foi a queda transitória da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, desestabilizando a homeostase. Detectou-se, também, a geração de espécies de oxigênio reativo (ROS). Os resultados mostraram que metil protodioscina inibiu a proliferação das células K562 através do bloqueio, via ciclo celular na fase G2 da mitose e, posteriormente, progredindo em apoptose (morte celular programada).

Analisando-se os resultados do bioensaio de fitotoxicidade com o produto químico à base de glyphosate em concentrações crescentes de 1,0; 5,0; 10; 50; 100; 500 e 1000  $\mu\text{M}$  no comprimento de parte aérea e de raiz, e massa seca de raízes e parte aérea nas plântulas de soja (Figura 37), não foi verificado efeito inibitório significativo na maioria das características avaliadas, exceto na massa seca de raízes na concentração de 500 e 1000  $\mu\text{M}$ . Uma provável explicação para essa manifestação de inibição nas raízes a partir de 500  $\mu\text{M}$  pode estar relacionada com a alta dose de glyphosate utilizada nestes tratamentos e a sensibilidade deste órgão vegetal a um efeito osmótico

Uma observação interessante neste bioensaio foi que, de maneira geral, as concentrações utilizadas de glyphosate estimularam o crescimento das plântulas de soja quando comparadas com a testemunha em água destilada, notadamente, a concentração de 10  $\mu\text{M}$ , favorecendo, principalmente, a massa seca de raízes. Segundo Moorman (1986), a concentração de glyphosate esperada na solução do solo, para doses recomendadas nas aplicações, é cerca de 7 $\mu\text{M}$ .

Morandi (1989) trabalhando com *Glomus mosseae*, verificou que a colonização da soja por esse microorganismo foi favorecida pela aplicação de glyphosate (0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  = 2,9  $\mu\text{M}$ ) depois da emergência das plantas. O autor sugere que esse efeito positivo

do glyphosate pode resultar da maior produção de isoflavonóides nas raízes, os quais podem promover a colonização micorrízica, conforme relatado por Siqueira et al.(1991).



**Figura 37.** Efeito das concentrações de glyphosate ( $\mu\text{M}$ ) em plântulas de soja, cv M-SOY 7908 RR, em relação à testemunha em água destilada.

Neste bioensaio, em particular, em que a testemunha foi composta por água destilada e não por MES como nos demais, uma possível explicação para o efeito benéfico do glyphosate nas plântulas de soja pode estar relacionado com a liberação de fósforo, presente na composição química da molécula do herbicida. O fósforo tem função de macronutriente para as plantas. É provável que o glyphosate, quando em solução, libere o fósforo para o meio e este é absorvido pelas plântulas de soja geneticamente modificadas para a resistência a este herbicida, contribuindo positivamente na nutrição destas.

Vários trabalhos de pesquisa relatam efeitos deletérios do glyphosate sobre culturas decorrentes da aplicação acidental ou da deriva. São encontradas informações para várias culturas, como para a do eucalipto (MACHADO et al., 2010), do café (FRANÇA et al., 2009) e do citros (GRAVENA et al., 2009). No entanto, Velini et

al.(2008) trabalhando com aplicação de sub-doses de glyphosate em algumas plantas, observou que o glyphosate pode estimular o crescimento da planta de milho, de soja, de eucalipto e da planta daninha *Commelina benghalensis*, fenômeno este conhecido por hormese.

### **Conclusões**

1 – As frações hidrometanólicas 2:2 e 3:1 (v/v) extraídas de *U. ruzizensis* foram as mais tóxicas para a soja, independentemente da aplicação do glyphosate.

2 – O composto alelopático majoritário, isolado do extrato metanólico de *U. ruzizensis*, independentemente da aplicação do glyphosate, é a protodioscina, uma saponina esteroidal. Há ainda outras duas saponinas esteroidais isoladas de *U. ruzizensis*, porém em identificação.

3 – A protodioscina é citotóxica para coleóptilo de trigo e fitotóxica para plântulas de soja.

4 – Pelas características das saponinas, plantas de *U. ruzizensis* dessecadas com glyphosate e expostas a chuvas podem apresentar menor teor de protodioscina e, conseqüentemente, menor atividade alelopática.

## REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2010. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2010. p. 475-498.

AHRENS, W. H. **Herbicide handbook**. 7.ed. Champaign: WSSA, 1994. 352 p.

ALMEIDA, F.S. Efeitos alelopáticos de resíduos vegetais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 221-236, 1991.

ALVARENGA, A.P. **Resposta da planta e do solo ao plantio direto e convencional, de sorgo e feijão, em sucessão a milho, soja e crotalária**. 1996. 162p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ALVARENGA, R.C; CABEZAS, W.A.L.; CRUZ, J.C.; SANTANA, D.P. Plantas de cobertura do solo para sistema plantio direto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.22, n,208, p.25-36, 2001.

ALVES, M. da C.S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p. 1083-1086, nov. 2004.

AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R. Glifosato: propriedade, toxicidade, usos e legislação. (Revisão). **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANDRADE, R.S.; STONE, L.F.; SILVEIRA, P.M. da. Culturas de cobertura e qualidade física de um Latossolo em plantio direto. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, Pb, v. 13, n. 4, p.411-418, 2009.

ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F. Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27, Brasília, 1999. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999.

ASMUS, G.L.; ANDRADE, P.J.M. **Reprodução do nematóide das galhas (*Meloidogyne javanica*) em algumas plantas alternativas para uso em sucessão à cultura da soja.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2001. 4p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Comunicado técnico, 37).

ASMUS, G.L. **Reação de algumas culturas de cobertura utilizadas no sistema plantio direto ao nematóide reniforme.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 4p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Comunicado técnico, 99).

BARBOSA-FERRREIRA, M. ,BRUM, K.B., FERNANDES C.E.S., MARTINS, C.F. ,MONTEIRO, L.C., REZENDE, K.G., RIET-CORREA, F., HARAGUCHI, M., WYSOCKI JUNIOR, LEMOS, R. A. A. Variations of saponina level x maturation in *Braquiaria brizantha* leaves. In 8th international Symposium on Poisonous Plants. João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Abstracts.** P. 13, 2009.

BARCIK, C. **Processos autoalelopáticos na cultura de alfafa (*Medicago sativa* L.) variedade crioula em solos de diferentes texturas.** 1999. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

BARNES, J. P.; PUTNAM, A. R. Rye residues contribute weed suppression in no-tillage cropping systems. **Chem. Ecologic**, v. 9, p. 1045-1057, 1983.

BERGERSEN, F. J. Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 21, n. 2, p. 121-140, 1971.

BETHLENFALVAY, G. J.; YODER, J. F. The *Glycine* – *Glomus* – *Rhizobium* symbioses. I. Phosphorus effects on nitrogen fixation and mycorrhizal infection. **Physiol. Plant.**, v. 52, n. 2, p. 141-145, 1981.

BONINI, E. P.; FERRO, A. P.; KERN, K. A.; FOLETTTO, M.; IWAN, E. L. I. Avaliação do efeito de extrato de *Brachiaria ruziziensis* sobre o metabolismo energético da soja. In: ENCONTRO MARINGAENSE DE BIOLOGIA, 12, 2010, Maringá. **Resumos...**

BOWERS, M. D.; STAMP, N. E. Effects of plant age, genotype, and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. **Ecology**, v.74, p.1778-1791, 1993.

BRANDELERO, E.M.; PEIXOTO, C.P.; RALISCH, R. Nodulação de cultivares de soja e seus efeitos no rendimento de grãos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.3, p.581-588, julho/setembro 2009.

BRUM, K. B.; HARAGUCHI, M.; GARUTTI, M. B.; NOBREGA, F. N.; ROSA, B.; FIORAVANTI, M. C. S. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. **Ciência Rural**, v.38, n.9, p. 279-281, 2009.

BRUM, K. B. **Papel das saponinas e do *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistema de pastejo**. Goiânia, UFG, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2006. 93p. Dissertação de Mestrado.

BRUNETON, J. Triterpenes and Steroids. In: BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Londres: Intercept Ltd, 1999. v.2, cap. X, p. 661- 719.

BUSSE, M.D.; RATCLIFF, A.W.; SHESTAK, C.J.; POWERS, R.F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p.1777-1789, 2001.

BUZATTI, W.J.S. Controle de plantas daninhas no sistema plantio direto na palha. In: PAULETTI, V.; SEGANFREDO, R. **Plantio direto: atualização tecnológica** : Fundação Cargill/Fundação, p.97-111, 1999.

CALEGARI, A.; MONDARD, A.; BULISANI, E. A.; WILDNER, L. P.; COSTA, M. B. B.; ALCÂNTARA, P. B.; MIYASAKA, S.; AMADO, T. I. C. **Adubação verde no Sul do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: ASPTA, 1993. 346 p.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Valor nutritivo da soja e potencial de utilização na dieta brasileira. Londrina: EMBRAPA-CNPSo (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 29), p. 13, 1988.

CARVALHO, S.I.C. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. Bandeirante**. 1993. 72 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

CASTELLANO, D. S. Optimización de bioensayos alelopáticos.: aplicación em la búsqueda de herbicidas naturales. 2002. 525 f. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) – Facultad de Ciências, Cádiz, 2002.

CHAKRAVARTY, P.; CHATARPAUL, L. Non-target effect of herbicides. II. The influence of glyphosate on ectomycorrhizal symbiosis of red pine *Pinus resinosa* under greenhouse and field conditions. **Pestic. Sci.**, v. 28, p. 243-248, 1990.

CHANDEL, R.S.; RASTOGI, R.P. Triterpenoid saponins and sapogenins: 1973-1978. **Phytochemistry**, v.19, p.1889-1908, 1980.

CHOU, C. H.; PATRICK, Z. A. Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. **Journal Chemistry Ecology**, v. 2, p. 369-387, 1976.

COBUCCI, T. Manejo integrado de plantas daninhas em sistema de plantio direto. In: ZAMBOLIM, L. **Manejo Integrado Fitossanidade**: cultivo protegido, pivô central e plantio direto. Viçosa: UFV, 2001. p. 583-624.

CORREIA, N.M.; DURIGAN, J.C.; KLINK, U.P. Influência do tipo e da quantidade de resíduos vegetais na emergência de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.24, p.245-253, 2006.

CUTHER, H. G. 1984 "A fresh look at the wheat coleoptile bioassay". Proceeding of the 11<sup>th</sup> Annual Meeting of the Plant Growth Regulator Society of America. 1-9.

DE COMBARIEU, E.; FUZZATTI, N.; LOVATI, M.; MERCALLI, E. Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Fisioterapia*, v 74, p. 583 – 591, 2003.

DERPSCH, R.; ROTH, C.H.; SIDIRAS, N.; KÖPKE, U. Importância da rotação de culturas. In: DERPSCH, R.; ROTH, C.H.; SIDIRAS, N.; KÖPKE, U. **Controle da erosão no Paraná, Brasil**: sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo. Eschborn: GTZ/IAPAR, 1991. p.147-164.

DUKE, S. O.; RIMANDO, A. M. et al. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 1, p. 340-344, 2003.

EDWARDS, C. A. Impacto of herbicides on soil ecosystems. **Crit. Rev. Plant.Sci.**, v.8, p. 221-257, 1989.

EINHELLIG, F.A. Plant x plant allelopathy: biosynthesis and mechanism of action. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais**. Lavras: UFLA, 1995. p. 59-74.



EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de Produção de Soja**: região central do Brasil 2005. Londrina, 2005. 239 p. Sistema de Produção 6).

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de Produção de Soja**: região central do Brasil. 1ª Edição. Londrina: EMBRAPA, 2007. 239 p

EVANS, W. C.; *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 14th ed., WB Saunders Company: London, 1996, cap. 7.

FAGERIA, N.K.; STONE, L.F. Produtividade de feijão no sistema plantio direto com aplicação de calcário e zinco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.73-78, 2004.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e fenologia. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. p. 21-54.

FERRAZ, F.M. Pastagens garantem o futuro da agropecuária brasileira. In: NAKAMAE I.J. (Ed.). **Anualpec – Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2003. p.55-56.

FERRO, A. P.; BONINI, E. A.; FOLETTTO, M.; KERN, K. A.; IWAN, E. L. I. Alteração da atividade respiratória de mitocôndrias de soja pelo extrato de *Brachiaria ruziziensis*. In: ENCONTRO MARINGAENSE DE BIOLOGIA, 12, 2010, Maringá. **Resumos...**

FLAØYEN, A.; WILKINS, A. L.; Di MENNA, M. E.; SANDVIK, M. The concentration of steroidal sapogenins in the degree of fungal infection on *Nartheicum ossifragum* plants in Møre and Romsdal Country, Norway. **International Symposium on Poisonous Plants**. 2004. Glasgow. Wallingford, Oxon: CABI Publishing 2001.

FONTANELI, R.S. et al. Rendimento e nodulação de soja em diferentes rotações de espécies anuais de inverno sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.2, p.349-355, fevereiro 2000.

FRANÇA, A. C. **Ação do glyphosate sobre o crescimento e teores de nutrientes em cultivares de café arábica**. 57p. 2009. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2009.

FRANZ, J. E. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 3-17.

GALLAGHER, R. S.; CARDINA, J.; LOUX, M. Integration of cover crops with post emergence herbicides in no-till corn and soybean. **Weed Sci.**, v. 51, p. 995-1001, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólicos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

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

GORLACH-LIRA, K.; STEFANIAK, O.; SLIZAK, W.; OWEDYK, I. The response of forest soil microflora to the herbicide formulations Fusilade and Roundup. **Microbiological Research**, v.152, p.319- 329, 1997.

GRAVENA, R.; VICTÓRIA FILHO, R.; ALVES, P. L. C. A.; MAZZAFERA, P.; GRAVENA, A. R. Low glyphosate rates do not affect citrus limonia Osbeck seedlings. **Pest Manag. Sci**; v.65, n.4, p.425, 2009.

GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. **Plant amino acids: biochemistry and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.

HAAHTELA, K.; KILPI, S.; KARI, K. Effects of phenoxy acid herbicides and glyphosate on nitrogenase activity (acetylene reduction) in root-associated *Azospirillum*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 53, p. 123-127, 1988.

HADERLIE, L. C.; SLIFE, F. W.; BUTLER, H.S. <sup>14</sup>C-glyphosate absorption and translocation in maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*) seeds and in soybean plants. **Weed Research**, v. 18, p. 269-273, 1978.

HANCOCK, C. R., BARLOW, H. W. B. and LACEY, H. J. The east malling coleoptiles straight growth method. **J. Exp. Botany**, Oxford, v.15, n. 1, p. 166-176, 1964.

HARAGUCHI, M.; CUNHA, H. A.; MIMAKI, Y.; BRUM, K. B.; LEMOS, R. A. A.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y. Furostanol glicosídicos nas folhas de *Brachiaria decumbens*. Poços de Caldas, MG, 2003. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 26<sup>TH</sup>. 2003, Poços de Caldas, MG, **Anais...** Poços de Caldas, Sociedade Brasileira de Química, 2003, PN-066.

HE, L.; PAN, X. Triterpenoids and steroids from *Aster poliothamnus*. **Planta Medica**, v.58, n.4, p.388, 1992.

HE, X.; QIAO, A.; LIU, B.; WANG, X.; WANG, G.; QU, G.; LIU, R. H.; YAO, X. Bioconversion of methyl protodioscin by *Penicillium melinii* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p.400 – 406, 2006.

HEAP, I. M. The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. **Pestic. sci.**,v. 51, p. 235-243, 1997.

HENDRIKS H; ANDERSON-WILDEBOER Y; ENGELS G; BOS R; WOERDENBAG HJ. The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. **J. Planta Med.**, v.63, p. 356-359, 1997.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Econ. Bot.**, n. 24, p. 408 – 421, 1970.

JAWORSKI, E.G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 20, p. 1195-1198, 1972.

JENKS, M. A.; TUTTLE, H. A.; FELDMANN, K. A.; The vegetable materia medica of western India. **Phytochemistry** , v. 42, p. 29-33, 1996.

JOHAL, G. S.; HUBER, D. M. Glyphosate effects on diseases of plants. **Europ. J. Agronomy**, v. 31, p.144 – 152, 2009.

KARABALIEV, M.; KOICHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. **Sensors and Actuators B**, v.88, p.101-105, 2003.

KAPS, M. A.; KUHNS, L. J. Glyphosate transfer between plants via mycorrhizal fungi. **Hortic. Sci.**, v. 22, n. 5, p. 652, 1987.

KICHEL, A. N.; MIRANDA, C. H. B.; TAMBOSI, S. A. T. Produção de bovinos de corte com a integração agricultura x pecuária. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS: TEMAS EM EVIDÊNCIAS, 1., 2000, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000. p. 51-68.

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

KISSMANN, K G, Plantas Infestantes e Nocivas, 2, 1, BASF, 1997, p.393-401.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, v.2, p. 363-386, 1996.

LUCIO, F. R.; COSTA, P. L. da; PAULO, A. A.; TIMOSSO, P. C. Influência da época de dessecação de diferentes coberturas vegetais na formação de nódulos em soja. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FCA-UNESP, 2007. P.162-164. 1CD-ROM.

LIU, M. J.; KIT, P. Y.; WANG, Z.; WONG, R. N.; WONG, S. Methil protodioscin induces G2/M arrest and apoptosis in K562 cells with the hyperpolarization of mitochondria. *Cancer Letters* xx (2005) 1–13

MACEDO, M.C.M. Integração lavoura e pecuária: o estado da arte e inovações tecnológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Campo Grande, Ms, v.38, p.133-146, 2009 (supl. Especial).

MACÍAS, F. A.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. G. Potential allelopathic activity of natural plant heliannanes: a proposal of absolute configuration and nomenclature. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, n. 9, p. 2173-2186, 2000.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M.; "Search for Standard Phytotoxic Bioassay of Allelochemicals. Selection of Standard Target Species." **J. Agric. Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512 – 2521.

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 a uso da água em plantas de eucalipto pulverizados com glyphosato. **P. Dawle**, v.288, n.2, p.15-327, 2010.

MACHADO, L. A. Z; ASSIS, P. G. de. Produção de palha e forragem por espécies anuais e perenes em sucessão à soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n. 4, p.415-422, 2010.

MACIEL, C. D. G. et al. Influência do manejo da palhada de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o desenvolvimento inicial de soja (*Glycine max*) e amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 365-373, 2003.

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

MALTY, J. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.24, p.285-291, 2006.

MAHATO, S.B.; SARKAR, S.K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v.27, p.3037-3067, 1988.

MÅRTENSSON, A.M. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.435-445, 1992.

MARTINS, D.; MARTINS, C.C.; COSTA, N.V. Potencial alelopático de soluções de solo cultivado com *Brachiaria brizantha*: Efeitos sobre a germinação de gramíneas forrageiras e plantas daninhas de pastagens. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 61-70, 2006.

MEAGHER, L. P.; MILES, C. O.; FAGLIARI, J. J. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence os

sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 38, n. 4, p. 271-274, 1996.

MELHORANÇA, A. L.; VIEIRA, C. P. Efeito da época de dessecação sobre o desenvolvimento e produção da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 21., 1999, Dourados. **Resumos...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 1999. p. 224-225.

MENEZES, L.A.S.; LEANDRO, W.M.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.P. de; FERREIRA, A.C. de B.; SANTANA, J. das G.; BARROS, R.G. Produção de fitomassa de diferentes espécies, isoladas e consorciadas, com potencial de utilização para cobertura dos solo. **Bioscience Journal**, v.25, p.7-12, 2009.

MIYASAKA, S., MEDINA, J. C. A soja no Brasil. 1ª ed., p. 479, 1981.

MILLER, D.A. Allelopathy in forage crop systems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 854-859, 1996.

MIRÓ, C.P.; FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E. Alelopatia de frutas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Revista Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Brasília, v.33, n.8, p. 1261-1270, 1998.

MOORMAN, T. B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. **Weed Science**, v. 34, p.628 – 633, 1986.

MOORMAN, T. B.; DOWLER, C. C. Herbicide and rotation effects on soil and rhizosphere microorganisms and crop yields. **Agric. Ecos. Environ.** v. 35, p.311 – 325, 1991.

MOORMAN, T. B.; BECERRIL, J. M.; LYDON, J.; DUKE, S. O. Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, p. 289-293, 1992.

MORANDI, D. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 27, p. 697-701, 1989.

MORRONE, O. & ZULOAGA, F. O. Revisión de las espécies sudamericanas nativas e introducidas de los géneros *Brachiaria* e *Urochloa* (Poaceae;Panicoideae: Paniceae). **Darwiniana**, v. 31, n. 1-4,: p. 43 – 109, 1992.

MUNDAY, S. C.; WILKINS, A. L.; MILES, C. O.; HOLLAND, P. T. Isolation and structure elucidation of dichotomin, a furostanol saponin implicated in hepatogenous photosensitization of sheep grazing *Panicum dichotomiflorum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 41, p. 267-271, 1993.

MURAISHI, C.T.; LEAL, A.J.F.; LAZARINI, E.; RODRIGUES, L.R.; GOMES JUNIOR, F. G. Manejo de espécies vegetais de cobertura do solo e produtividade do milho e da soja em semeadura direta. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.27, p.199-207, 2005.

NUNES, A. S.; ALVES, P. L. C. A.; ALVES, P. J.; TIMOSSI, P. C. Comportamento da comunidade infestante da cultura da soja em função de coberturas mortas e aplicação de herbicidas. In: XVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2005, Jaboticabal. **Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2005.

NUNES, A. S.; TIMOSSI, P. C.; PAVANI, M. C. M. D.;ALVES, P. L. C. A. Épocas de manejo químico de *Brachiaria decumbens* antecedendo o plantio direto de soja. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 297-302, 2009.

NUNES, U. R. et al. Produção de palhada de plantas de cobertura e rendimento do feijão em plantio direto. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, n. 6, p. 943-948, 2006.



- OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, n. 967, p. 147-162, 2002.
- OLIBONE, D.; CALONEGO, J.C.; PAVINATO, P.S.; ROSOLEM, C.A. Crescimento inicial da soja sob o efeito de resíduos de sorgo. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 255-261, 2006
- OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; COSTA, J. M.; CAVALIERI, S. D.; ARANTES, J. G. Z.; ALONSO, D. G.; ROSO, A. C.; BIFFE, D. F. Interação entre sistemas de manejo e de controle de plantas daninhas em pós-emergência afetando o desenvolvimento e a produtividade da soja. **Planta Daninha**, vol.24, n. 4, p. 721-732, 2006.
- OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; DVORANEN, E. C.; CONSTANTIN, J.; VALIERI, S. D.; FRANCHINI, L. H. M.; RIOS, F. A.; BLAINSKI, E.. Influência do glyphosate sobre a nodulação e o crescimento de cultivares de soja resistente ao glyphosate. **Planta Daninha**, vol.26, n. 4, p. 831-843, 2008.
- PACHECO, L.P.; PIRES, F.R.; MONTEIRO, F.P.; PROCÓPIO, S. de O.; ASSIS, R.L. de; CARMO, M.L. do.; PETTER, F.A. Desempenho de plantas de cobertura em sobressemeadura na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.815-823, 2008.
- PACHECO, L.P.; PIRES, F.R.; MONTEIRO, F.P.; PROCÓPIO, S. de O.; ASSIS, R.L. de; CARGNELUTTI FILHO, A.; CARMO, M.L. do; PETTER, F.A. Sobressemeadura da soja como técnica para supressão da emergência de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.27, p.455-463, 2009.
- PACOVSKY, R. S.; PAUL, E. A.; BETHLENFALVAY, G. J. Response of mycorrhizal and P fertilized soybeans to nodulation by *Bradyrhizobium* or ammonium nitrate. **Crop. Sci.**, v. 26, n. 1, p. 145-150, 1986.

PADGETTE, S. R. et al. New weed control opportunities: development of glyphosate-tolerant soybeans. In: DUKE, S. O. (Ed.). **Herbicide resistant crops**. Boca Raton: CRC, 1995. p.54-80.

PEIXOTO, M.F.; SOUZA, I.F. Efeitos de doses de imazomox e densidades de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) sob plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 2, p. 252-258, 2002.

PLINE-SRNIC, W. Physiological mechanisms of glyphosate resistance. **Weed Tech.**, v.20, n.2, p.290-300, 2006.

PRESTON, C.; WALKELIN, A. M. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation pattern. **Pest Manag.**, Washington, v.64, n.4, p.372-376, 2008.

PUTNAM, A.R.; DUKE, W.D. Allelopathy in agroecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.16, p.431-451, 1978.

QUINN, J.P.; PEDEN, J.M.M.; DICK, R.E. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.511-516, 1988.

REDDY, K. N.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M. Effect of glyphosate on growth, chlorophyll content and nodulation in glyphosate-resistant soybeans (*Glycine max*) varieties. **J. New Seeds**, v. 2, n. 1, p. 37-52, 2000.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 16, p. 5139-5143, 2004.

REDDY, K. N.; ZABLOTOWICZ, R. M. Glyphosateresistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Sci.**, v. 51, p. 496-502, 2003.

REZENDE, C de P.; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R.; SANTOS, I.P.A. **Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens plantas forrageiras**. Lavras: UFLA, 2003. p.18. Boletim Agropecuário.

RICE, E.L. **Allelopathy**. New York: Academic Press, 1974.

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2. ed. New York: Academic Press, 1984. 422 p.

ROSLYCKY, E.B. Glyphosate and the response of the soil microbiota. **Soil Biology and Biochemistry**, v.14, p.87-92, 1982.

SANTOS, A.; FLORES, M. Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, p.349-352, 1995.

SANTOS, J. B. et al. Comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. sob efeito de componentes do glyphosate potássico. **Rev. Ci. Agron.**, v. 34, n. 2, p. 201-206, 2003.

SANTOS, J. B.; JACQUES, R. J. S.; PROCÓPIO, S. O.; KASUYA, M. C. M.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A. Efeitos de diferentes formulações comerciais de glyphosate sobre estirpes de *Bradyrhizobium*. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 293-300, 2004.

SANTOS, J. B. et al. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. **Crop Protec.**, v. 24, p. 543-547, 2005.

SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; REIS, M. R.; SILVA, A. A.; FIALHO, C. M. T.; FREITAS, M. A. M. Época de dessecação anterior a semeadura sobre o desenvolvimento da soja resistente ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 869-875, 2007.

SANTOS, J.C.F.; SOUZA, I.F. de.; MENDES, A.N.G.; MORAIS, A.R. de.; CONCEIÇÃO, H.E.O.; MARINHO, J.T.S. Influência alelopática das coberturas mortas de café (*Coffea*

arabica L.) e casca de arroz (*Oryza sativa* L.) sobre o controle do caruru de mancha (*Amaranthus viridis* L.) em lavoura de café. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 5, p. 1105-1118, 2001.

SANTOS JUNIOR, H. L. **Estudo da toxicidade de Diferentes Estágios de Crescimento de *Braquiaria decumbens* em ovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 65p. Dissertação de Mestrado.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2000. p. 232-354.

SANTOS, T. L. Soja. In: CASTRO, P.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. (Ed.). **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2008. P. 158 – 175.

SCALÉA, M. **Plantio direto: inovações técnicas**. Revista Plantio Direto, edição nº 83 – Setembro/Outubro de 2004. Aldeia Norte Editora, Passo Fundo-RS.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, Capítulo 15, p. 301-332, 2001.

SENDULSKY, T. *Brachiaria*: taxonomy of cultivated and native species in Brazil. **Hoehna**, V. 7, 1978; p. 99-139.

SERRÃO, E.A.D. & SIMÃO NETO, M. **Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Evrard.** Belém, Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Norte, 1971. 31p. (IPEAN. Série: Estudos sobre forrageiras na Amazônia, v.2., n.1).

SHAO, Y. U.; POOBRASERT, O.; KENNELLY, E. J.; CHIN, C. K.; H. O. C. T.; HUANG, M. T.; GARRISON, S. A.; CORDELL G. A. Steroidal saponins from *Asparagus officinalis* and their cytotoxic activity. **Planta Medica**, New York, v. 63, n. 3, p. 258 – 262, 1997.

SILVA, A.C. et al. Efeitos de doses reduzidas de fluazifop-p-butil no consórcio entre soja e *Brachiaria brizantha*. **Planta Daninha**, Viçosa, Mg, v. 22, n. 3, p.429-435, 2004.

SILVA, A.C. et al. Épocas de emergência de *Brachiaria brizantha* no desenvolvimento da cultura da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p.769-775, 2005.

SILVA, A. C; SANTOS, J. B.; KASUYA, M. C. M.; SIVA, A. A.; MANABE, A. Micorrização e épocas de dessecação de *Brachiaria brizantha* no desenvolvimento da soja. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 271-277, 2006.

SILVA, A.C. et al. Acúmulo de macro e micronutrientes por soja e *Brachiária brizantha* emergida em diferentes épocas. **Planta Daninha**, Viçosa, Mg, v. 27, n. 1, p.49-56, 2009.

SILVA, R. G. **Morfologia do dossel e desempenho produtivo de ovino em *Panicum maximum* (Jacq) cv. Tanzânia sob três períodos de descanso.** 2004. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, v. 118, p. 87 – 93, 1991.

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

SOUZA FILHO, A. P. S. RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D. Potencial alelopático de forrageiras tropicais: efeitos sobre invasoras de pastagens. **Planta Daninha**, v. 15, n. 1, p. 53-60, 1997a.

SOUZA FILHO, A. P. S.; RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D. Inibição da germinação e alongamento da radícula de invasoras de pastagem pelos extratos aquosos de gramíneas forrageiras tropicais. **Pasturas Trop.**, v. 19, n. 1, p. 45-50, 1997b.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. Mecanismos de ação dos agentes alelopáticos. **In:** SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M., editores. *Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. P. 131-154, 2002.

SOUZA, L. S.; VELINI, E. D.; MAIOMONI-RODELLA, R. C. S. Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 343-354, 2003.

SOUZA, L.S.; VELINI, E.D.; MARTINS, D.; ROSELEM, C.A. Efeito alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 657-668, 2006.

SOUZA, R. F. et al. Micorriza e fósforo no crescimento de *Brachiaria brizantha* e *Stylosanthes guianensis* em solo de baixa fertilidade. 2. Acúmulo de minerais. **Past. Trop.**, v. 21, n. 3, p. 24-30, 1999.

SOUZA SOBRINHO, F. de. Melhoramento de forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 5., 2005, Lavras. **Anais**. Lavras: UFLA, 2005. v.1, p.65-120.

SOUZA SOBRINHO, F. de; LÉDO, F.J. da S.; KOPP, M.M.; PEREIRA, A.V.; SOUZA, F.F. de. Melhoramento de gramíneas forrageiras na Embrapa Gado de Leite. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 7., 2009, Lavras. **Anais**. Lavras: UFLA, 2009. p.98-111.

SOUZA SOBRINHO, F. de; BORGES, V.; LÉDO, F.J. da S.; KOPP, M.M. Repetibilidade de características agronômicas e número de cortes necessários para seleção de *Urochloa ruziziensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n. 6, p.579-584, 2010.

STONE, L.F.; MOREIRA, J.A.A. Efeitos de sistemas de preparo do solo no uso da água e na produtividade do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.835-841, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **PLANT PHYSIOLOGY**. 5 ed. U.S.A., 2010. 792 p.

TIMOSSI, P.C. Manejo de plantas de cobertura e controle integrado de plantas daninhas no plantio direto da soja. 2005. 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

TIMOSSI, P. C.; DURIGAN, J. C.; LEITE, G. J. Eficácia de glyphosate em plantas de cobertura. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 475-480, 2005.

TOLEDO-SOUZA, E.D. de; SILVEIRA, P.M. da; LOBO JUNIOR, M.; CAFÉ FILHO, S.C. Sistemas de cultivo, sucessões de culturas, densidade do solo e sobrevivência de patógenos de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.971-978, 2008.

TORRES, J.L.R.; PEREIRA, M.G.; FABIAN, A.J. Produção de fitomassa por plantas de cobertura e mineralização de seus resíduos em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.421-428, 2008.

TURNER, D. J.; LOADER, M. P. C. Studies with solubilized herbicide formulations. In: BRITISH WEED CONTROL CONFERENCE, 12., 1974, Brington. **Proceedings...** London, 1974. p. 177-184.

VALLE, C.B. do; SAVIDAN, Y.H. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE C.B. do (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Campo Grande: Embrapa-CNPQC, 1996. p.147-163. (CIAT. Publication, 259).

VELINI, E. D.; ALVES, E.; GODOY, M. C.; MESCHÉDE, D. K.; SOUZA, R. T.; DUKE, S. O. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Manag. Sci.**, v. 64, n. 4, p. 489-496, 2008.

VOLL, E; ADEGAS, F. S.; GAZZIERO, D. L. P. Efeitos do ácido aconítico em sementes de plantas daninhas de diferentes origens. **Planta Daninha**, v. 28 ; n.1 ; p.13 - 22, 2010.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. **Plant and Soil**, v.122, p.29-37, 1990.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Relative importance of the effect of 2,4-D, glyphosate, and environmental variables on the soil microbial biomass. **Plant and Soil**, v.134, p.209-219, 1991.

WANDERLEY, M. G. L; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, Volume 1- Poaceae. **Hucitec**, SP. 2001.



WATERMAN, P. G.; MOLE, S.; **Analysis of phenolic plant metabolites**, 1st ed., Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1994, cap. 3.

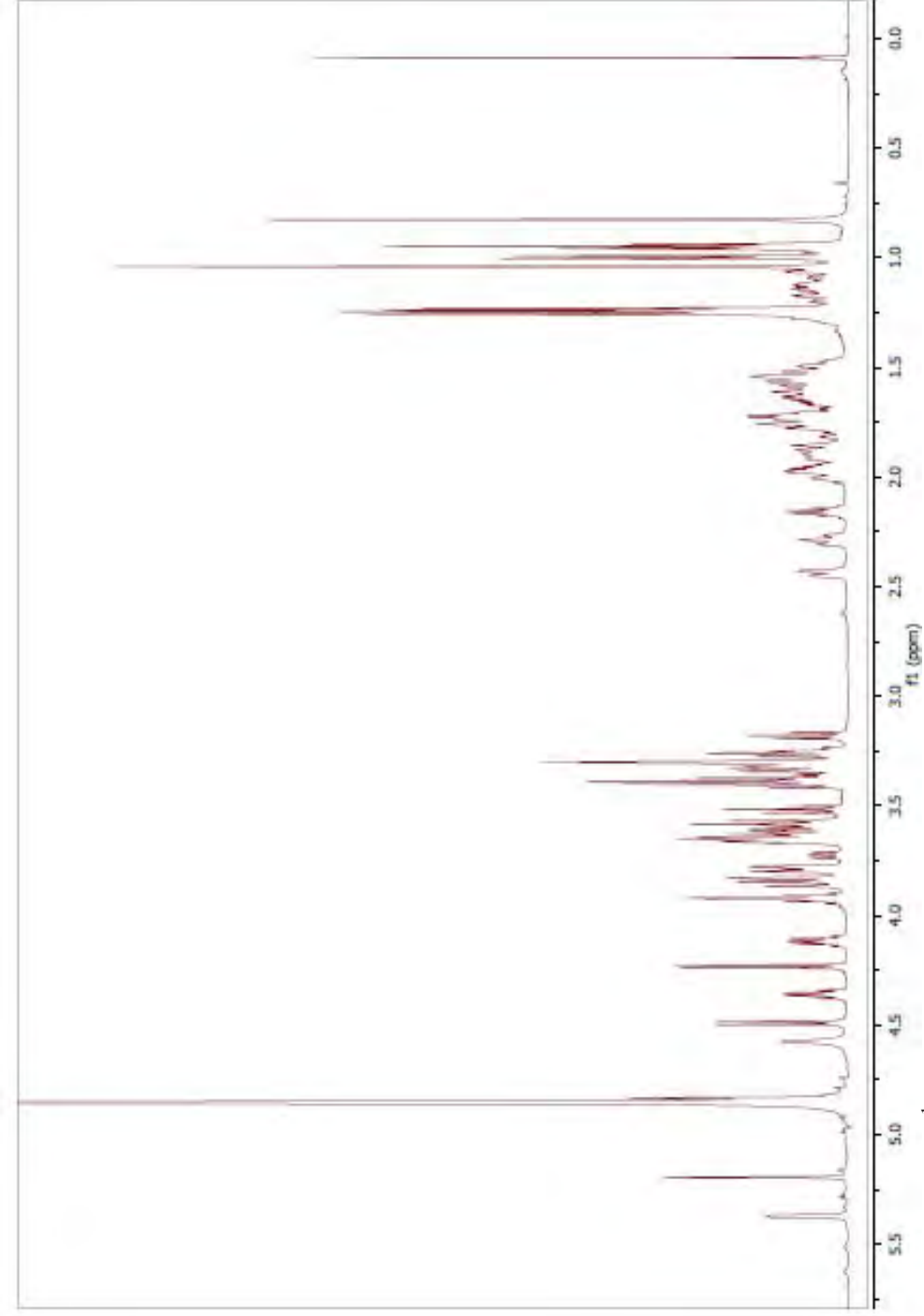
WILKINSON, R. E.; KASPERBAUER, M.J. Screening of Indian plants for biological activity. **Phytochemistry**, v. 11, p. 2439-2442, 1972.

WHITTAKER, R.H.; FEENY, P.P. Allelochemicals: chemical interaction between species. **Science**, v. 171, n. 3973, p. 757- 770, 1971.

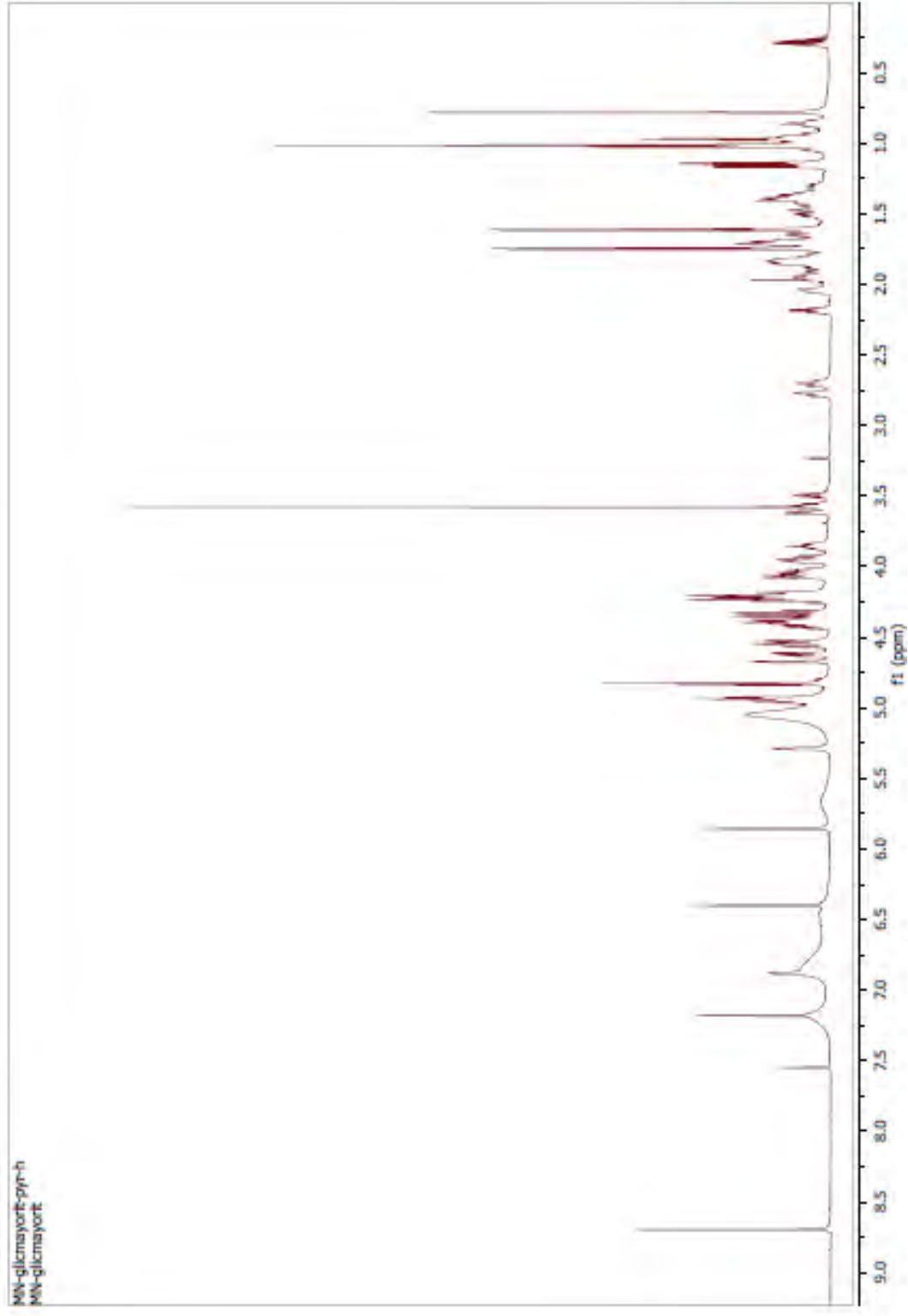
ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate on the Bradyrhizobium japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **J. Environ. Qual.**, v. 33, n. 3, p. 825-831, 2004.

**ANEXOS**

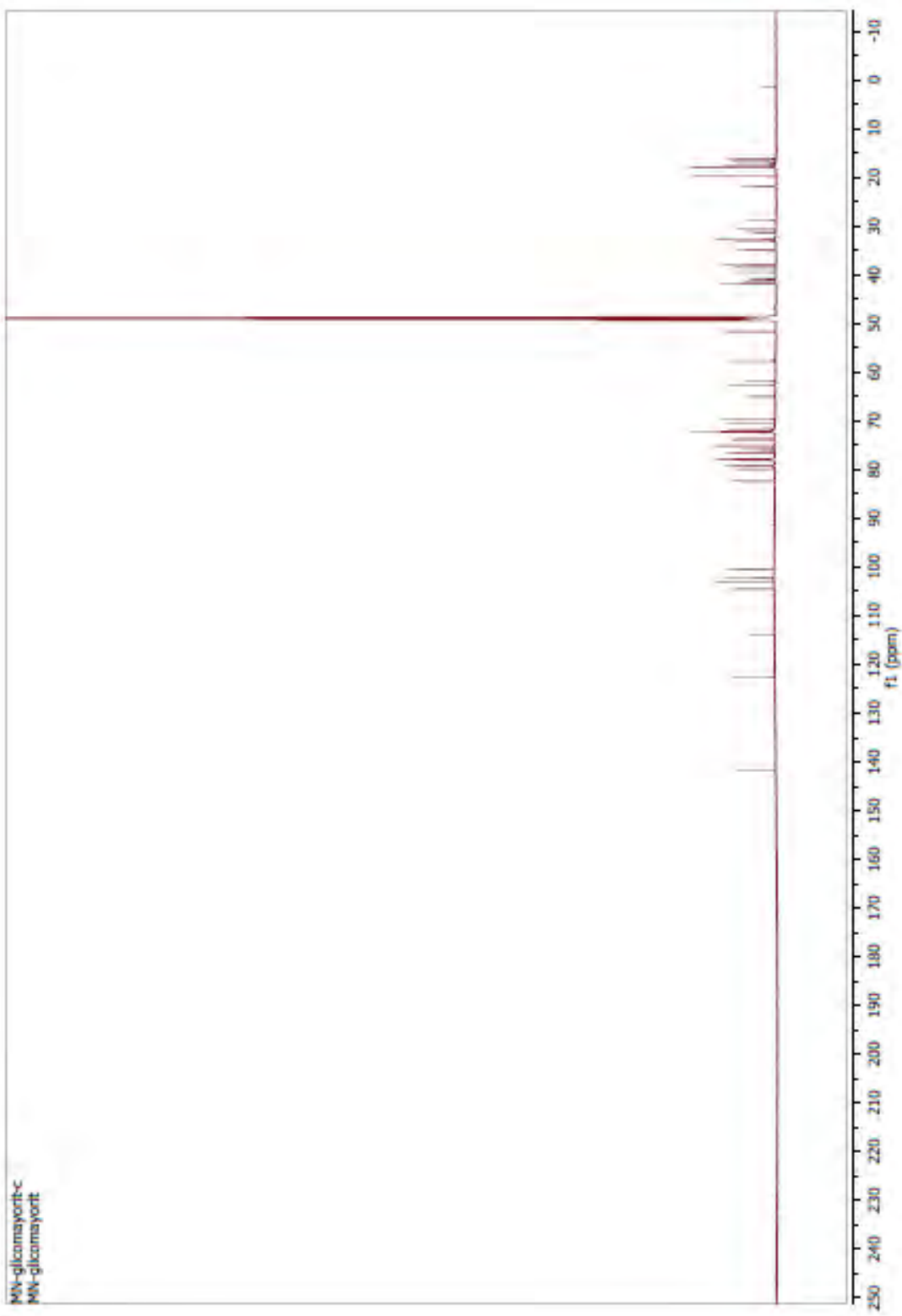
**ANEXOS 1.**



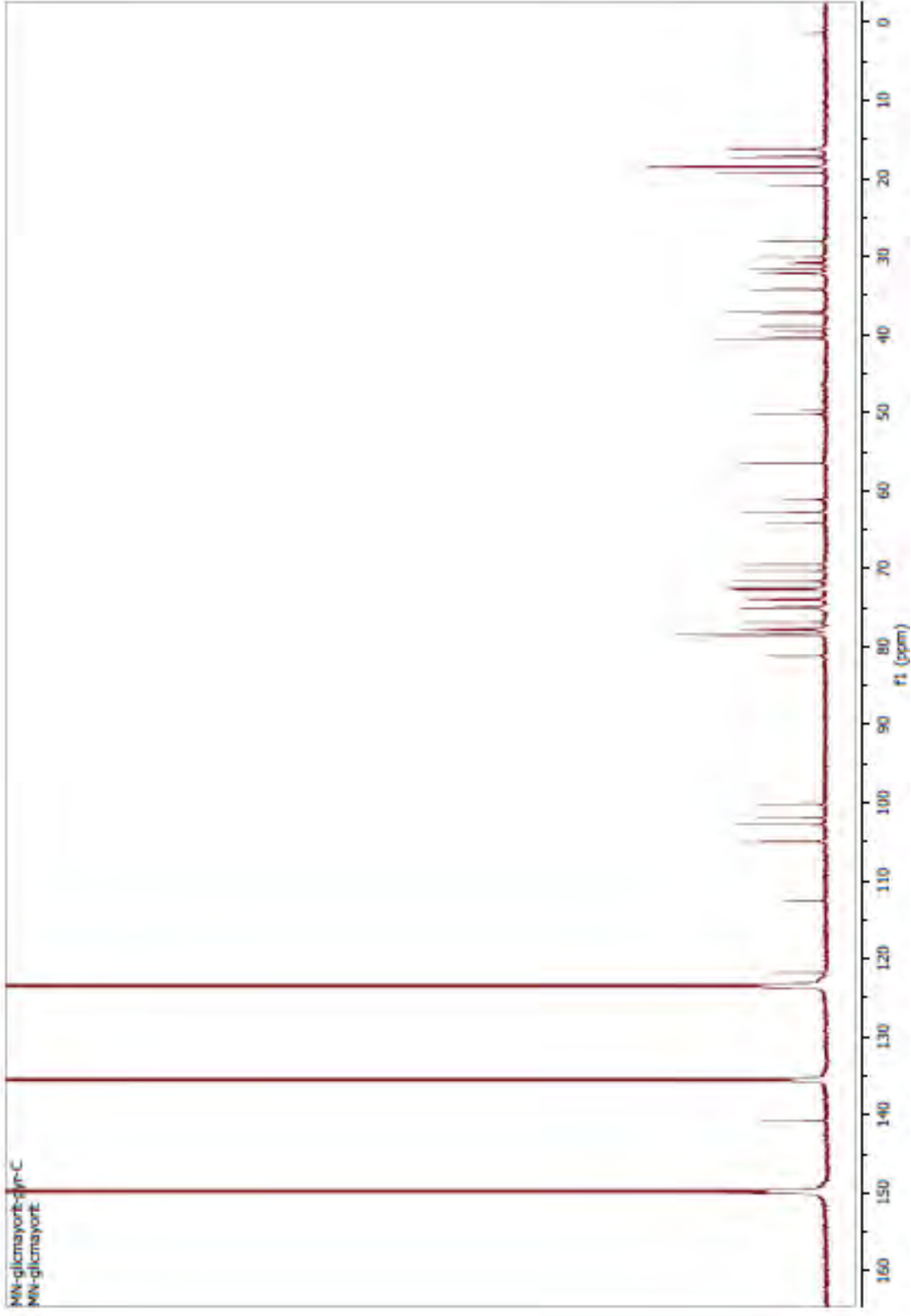
**Figura 1-A.** Espectro de <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, piridina) do composto protodioscina.



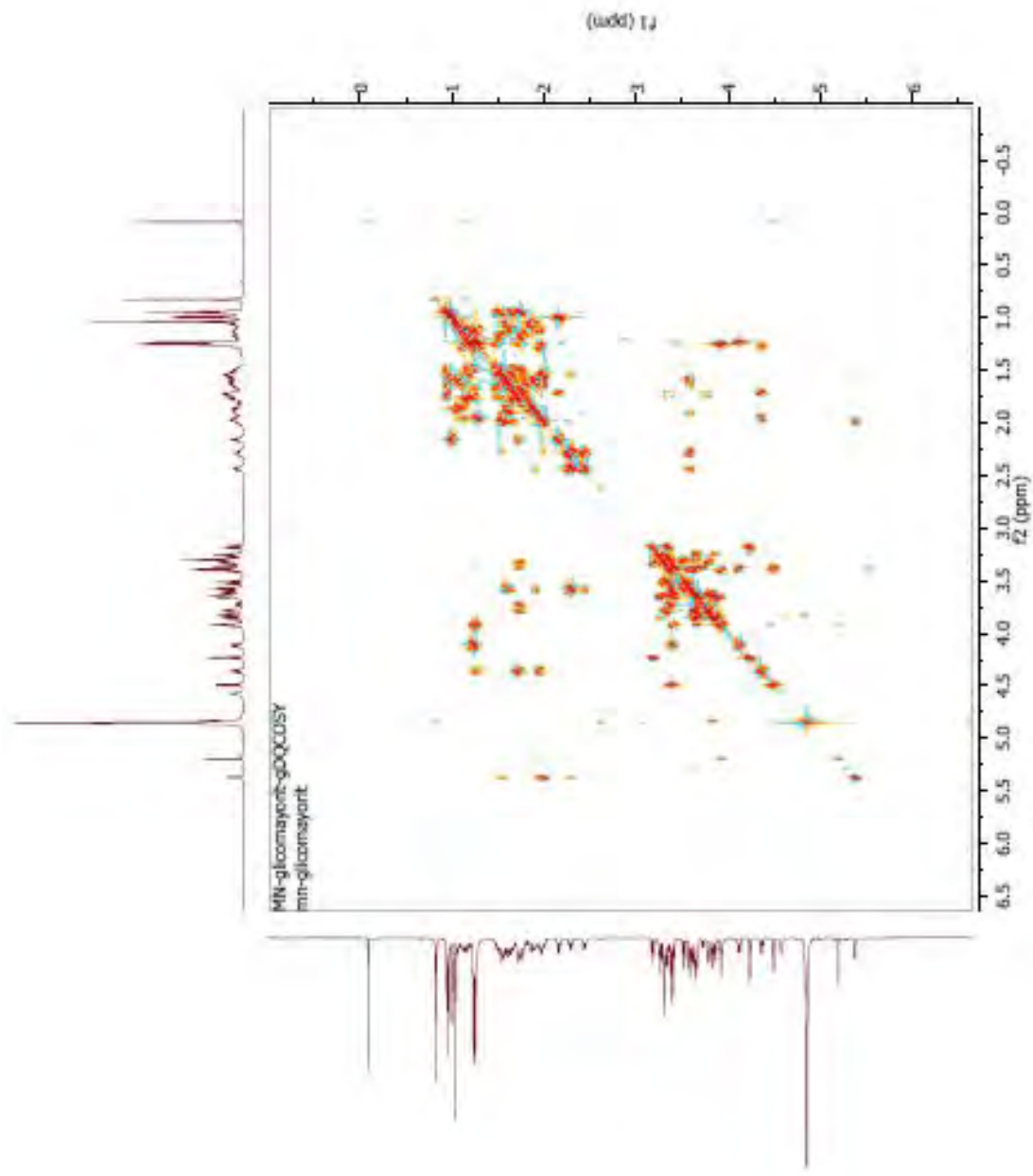
**Figura 1-B.** Espectro de <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, piridina) do composto protodioscina.



**Figura 1-C.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR (piridina) do composto protodioscina



**Figura 1-D.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR ( piridina) do composto protodioscina.



**Figura 1-E.** Mapa de contorno de gDQCOSY do composto protodioscina.

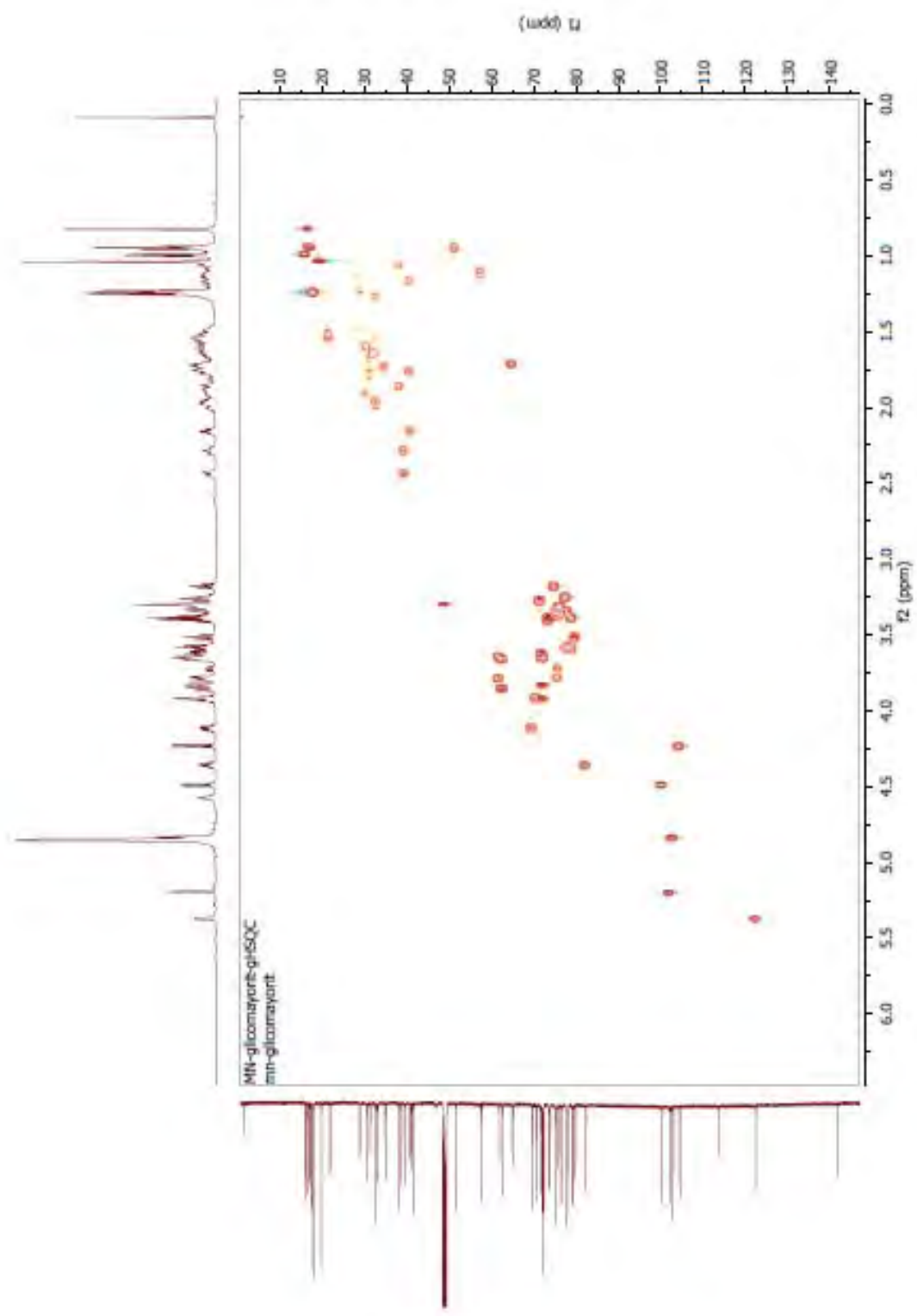
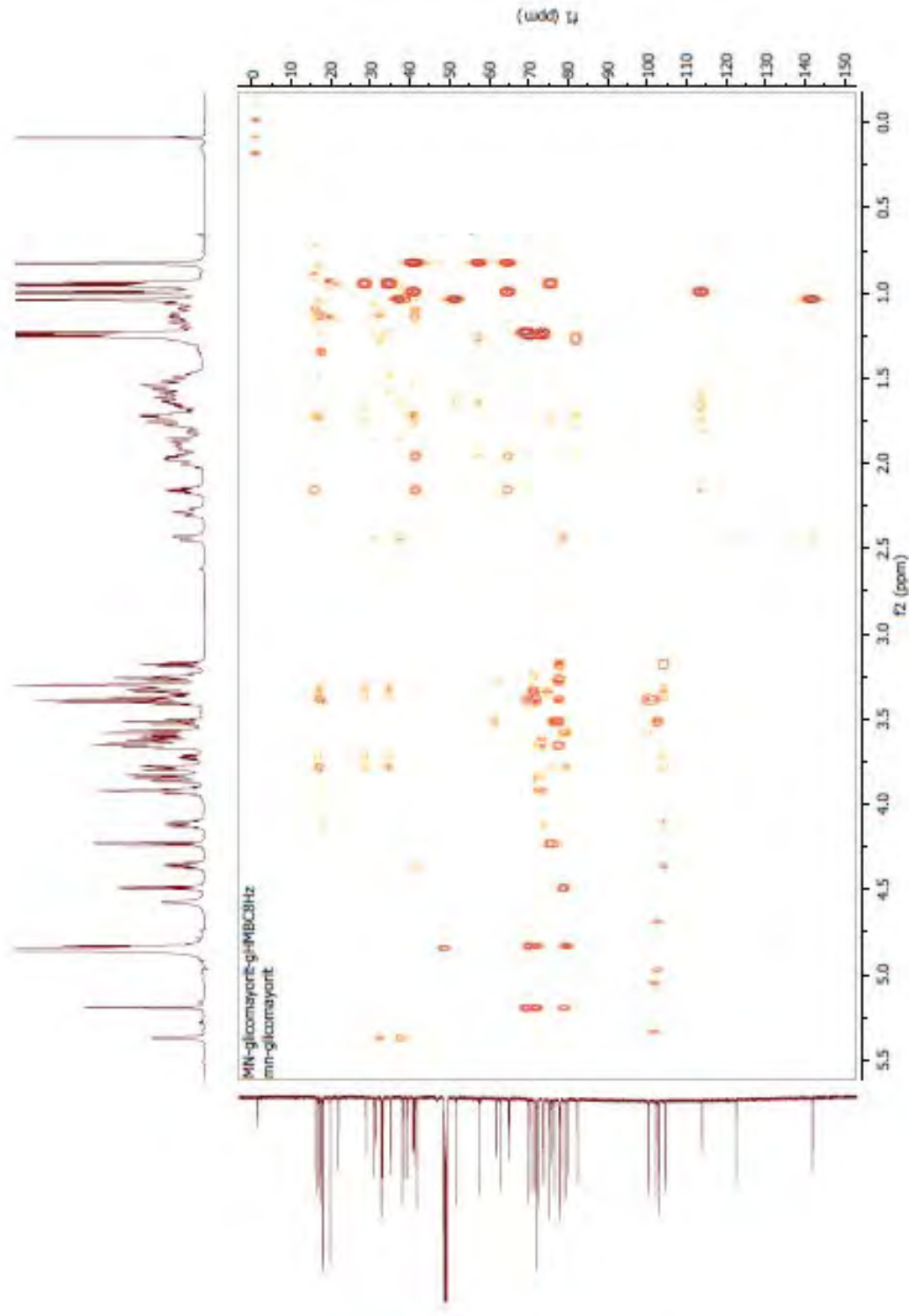


Figura 1-F. Mapa de contorno de gHSQC do composto protodioscina.





**Figura 1-G.** Mapa do contorno de gHMBCHz do composto protodioscina.

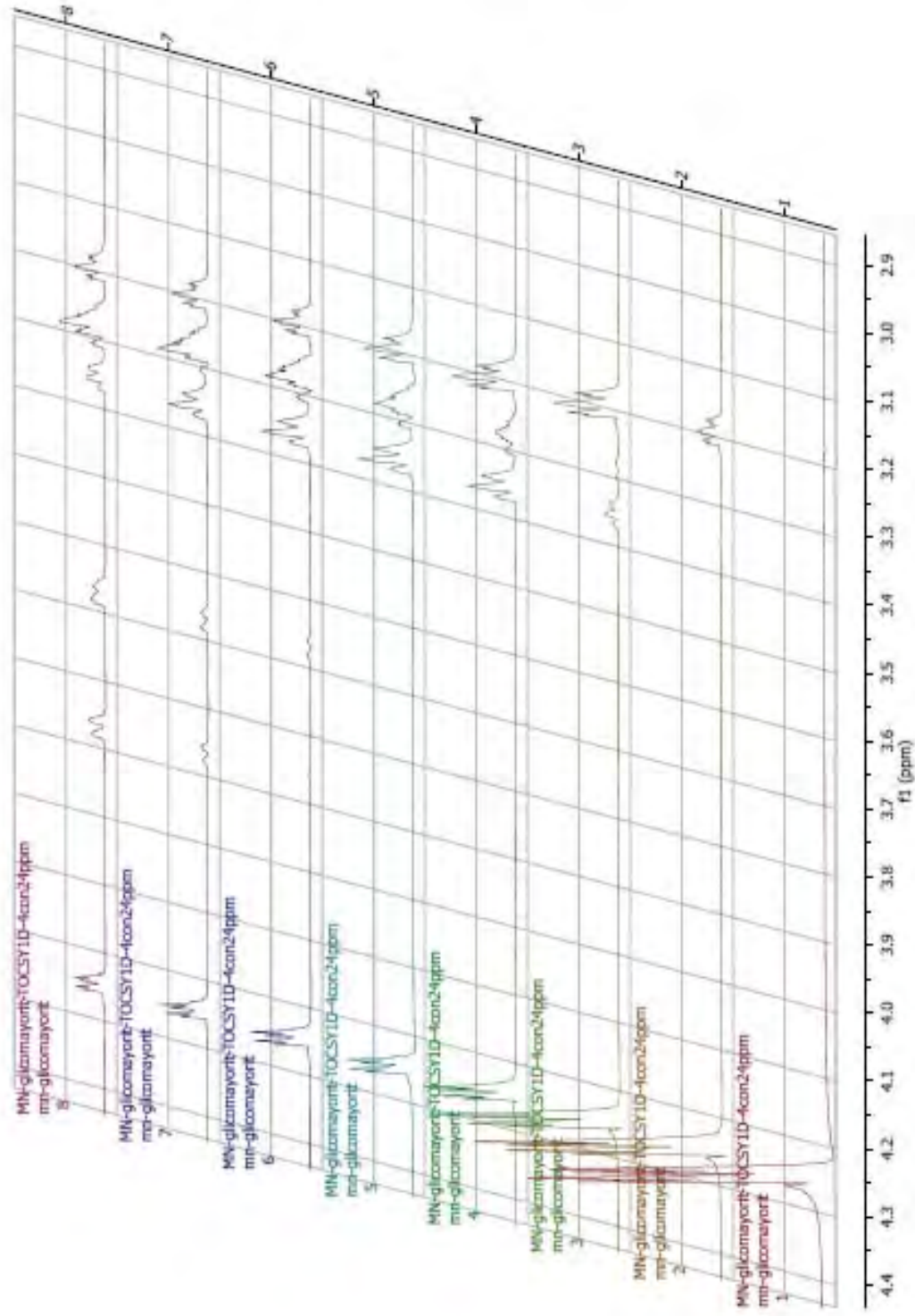
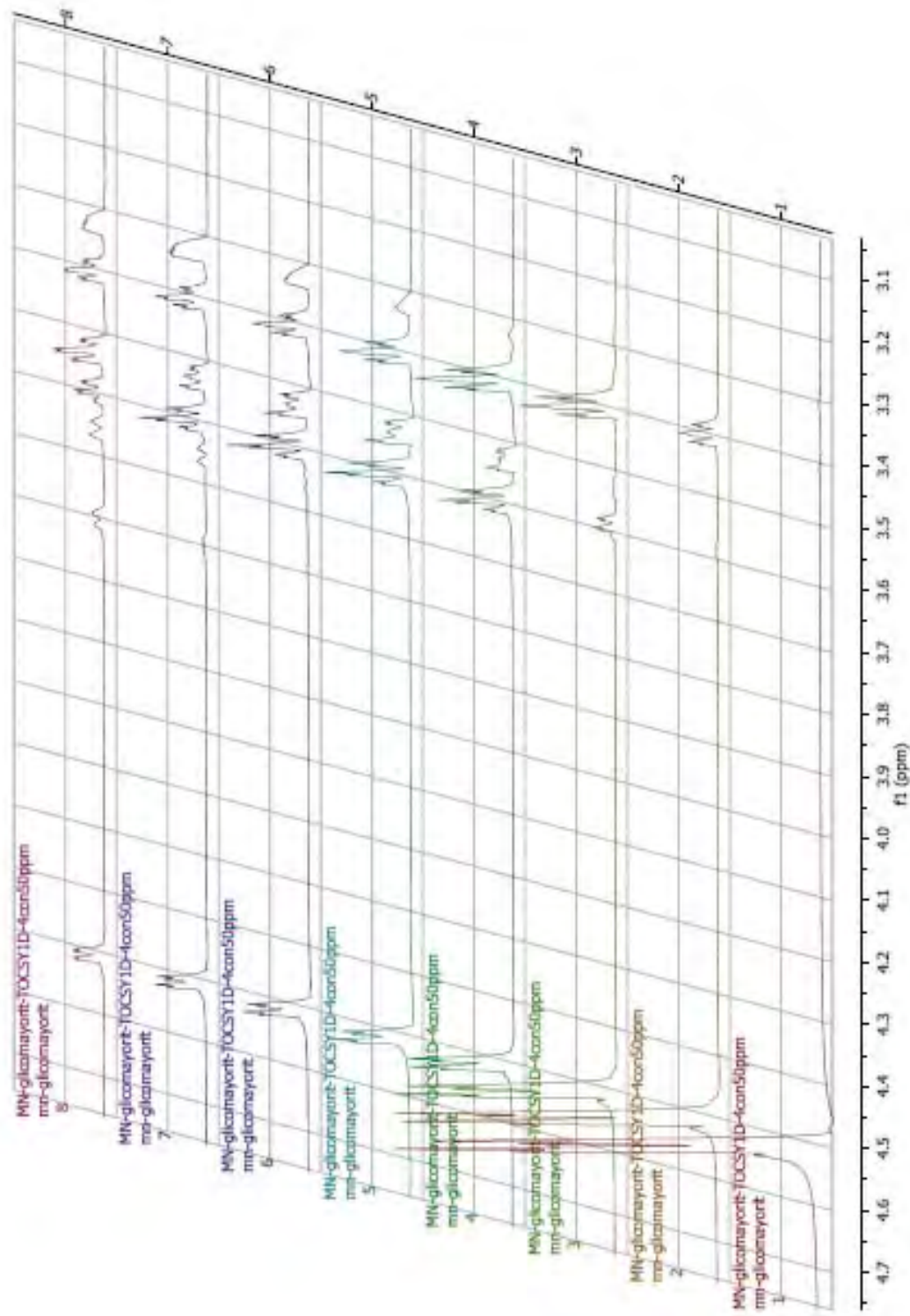


Figura 1-H. Espectro de TOCSY1D-4con24ppm do composto protodioscina.



**Figura 1-I.** Espectro de TOCSY1D-4con50ppm do composto protodioscina.

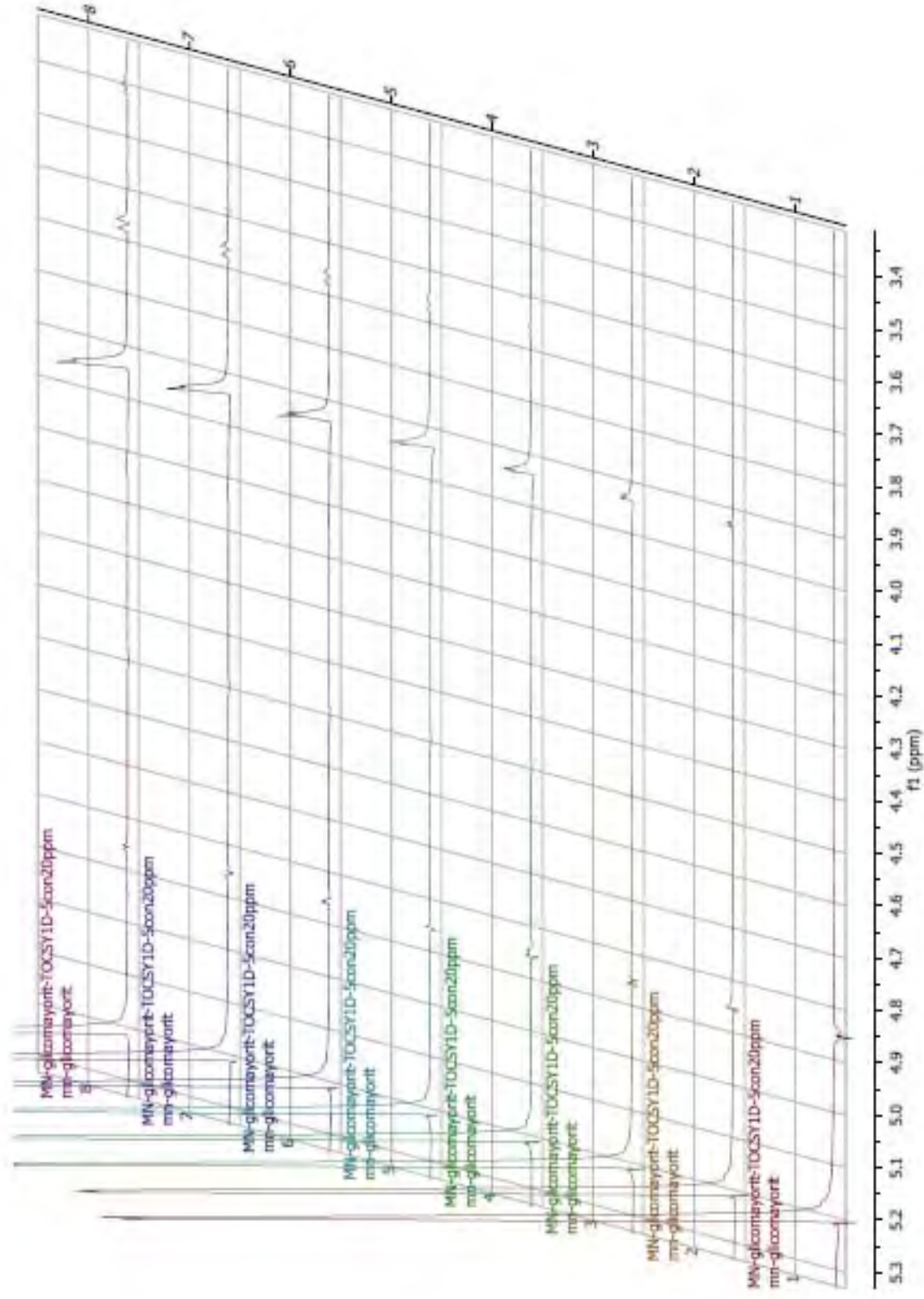
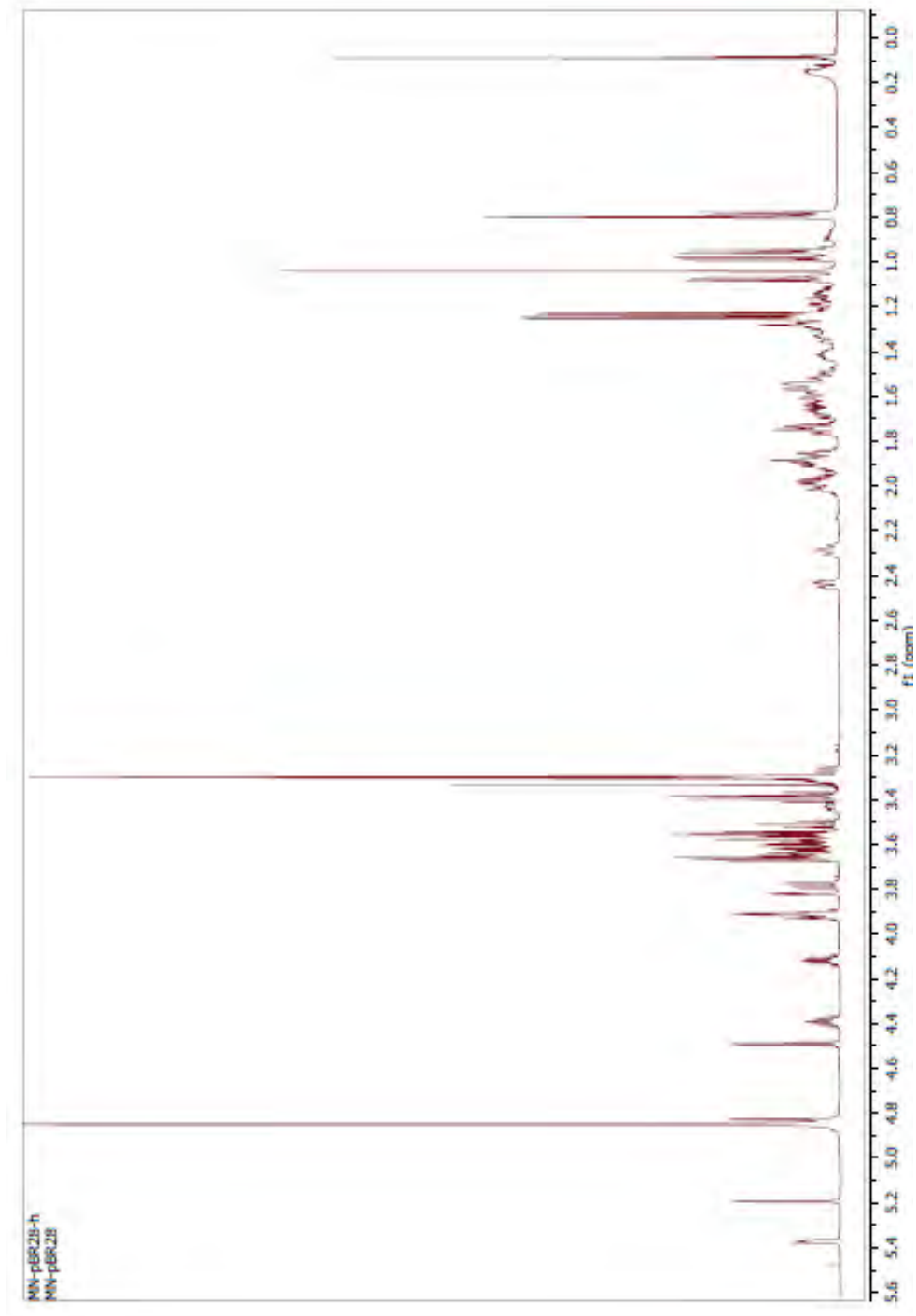
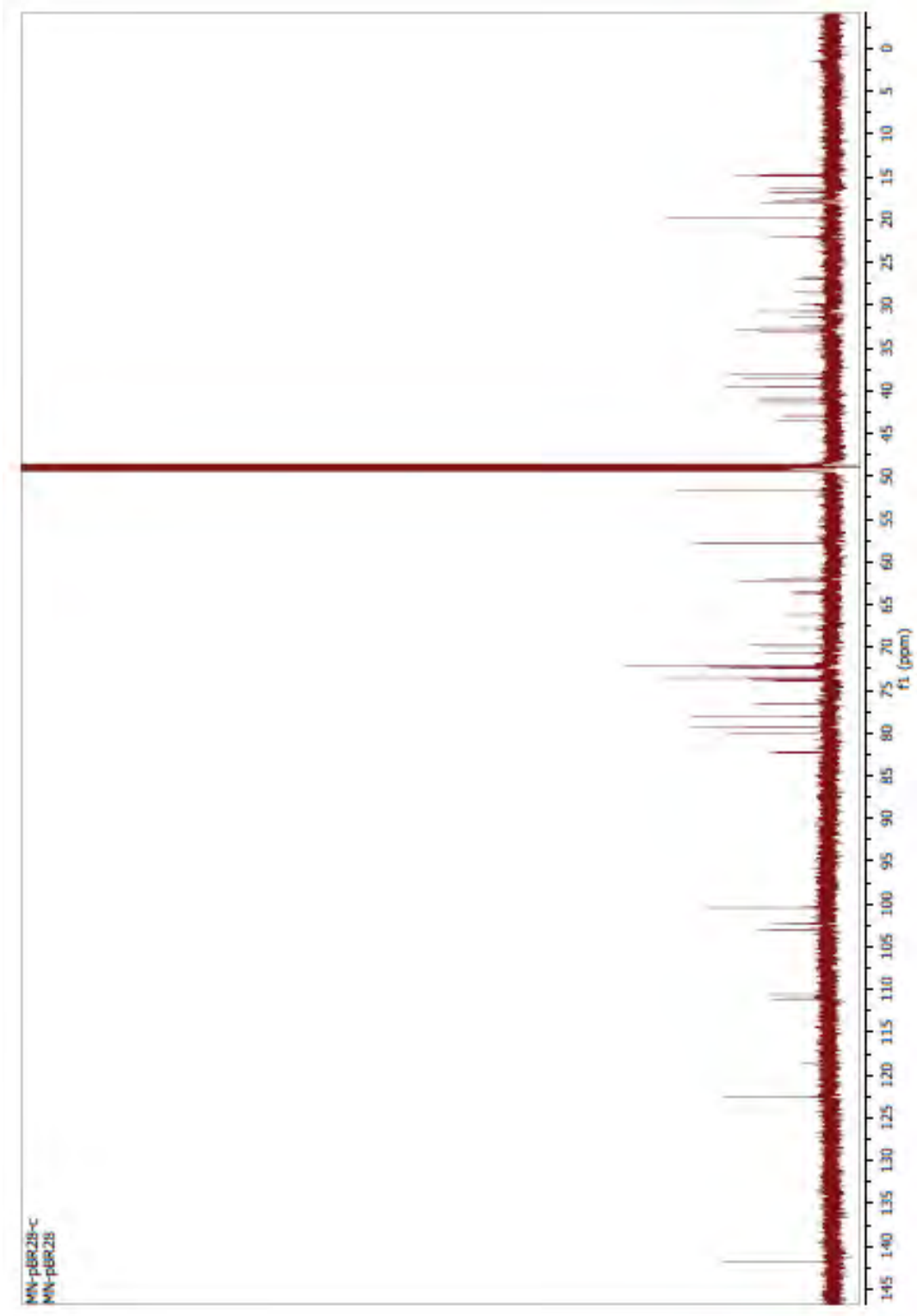


Figura 1-J. Espectro de TOCSY1D-4con20ppm do composto protodioscina.

## ANEXOS 2.

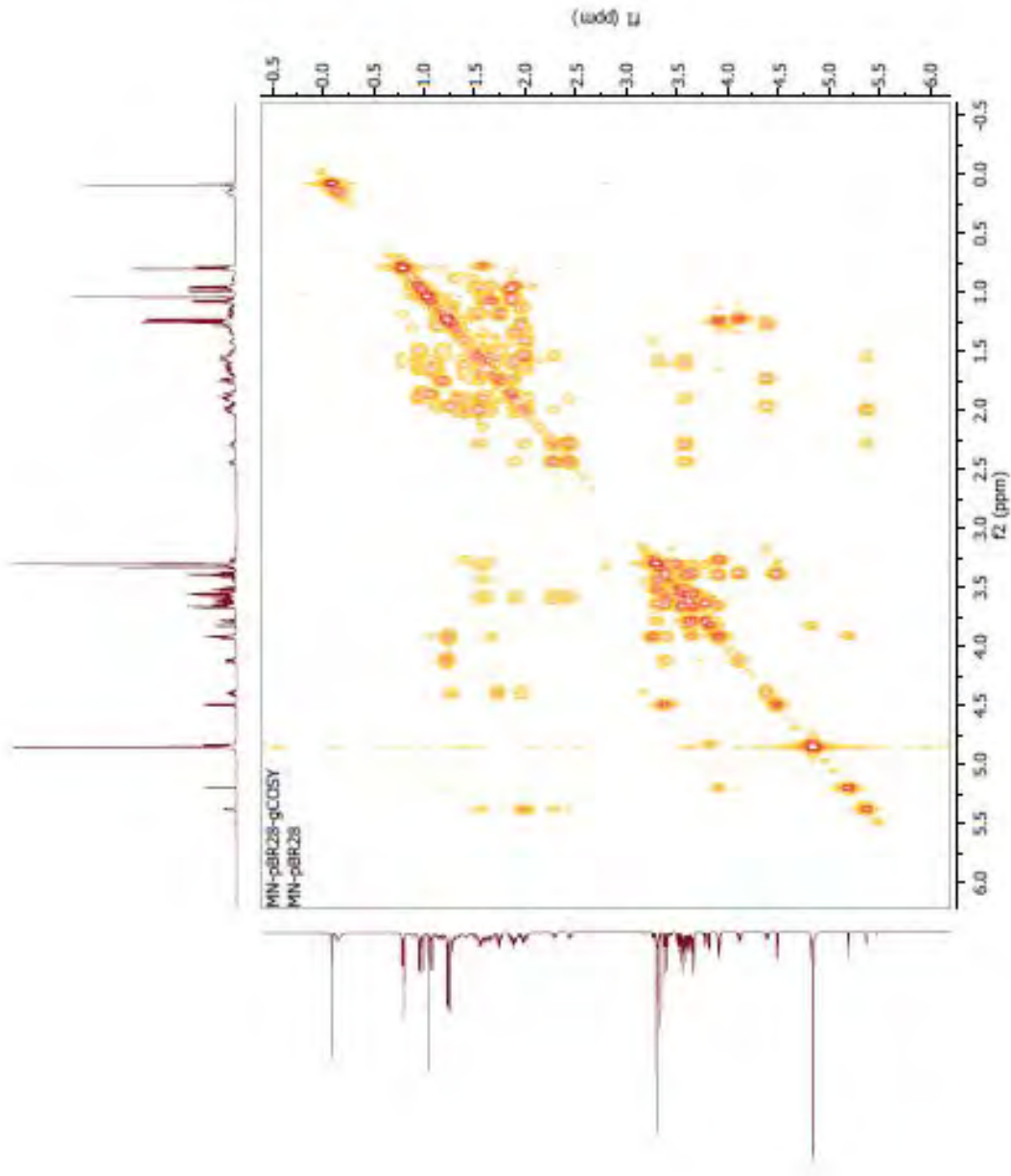


**Figura 2-A.** Espectro de <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, piridina) do composto codificado como MN-pBR28 e identificado como uma saponina esteroidal derivada da bioconversão microbiana da metil-protodioscina.

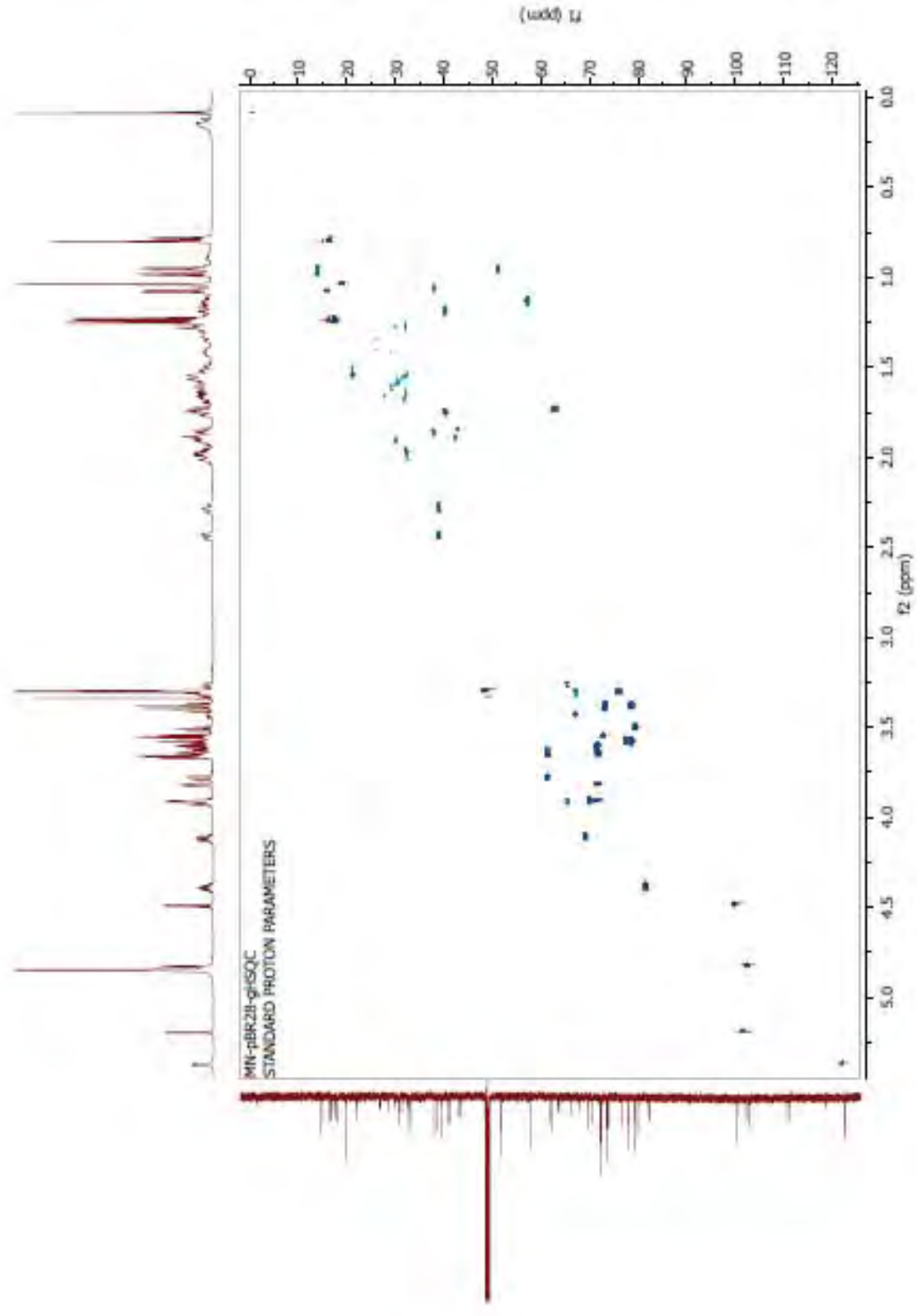


**Figura 2-B.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR do composto codificado como MN-pBR28 e identificado como uma saponina esteroidal derivada da bioconversão microbiana da metil-protodioscina.



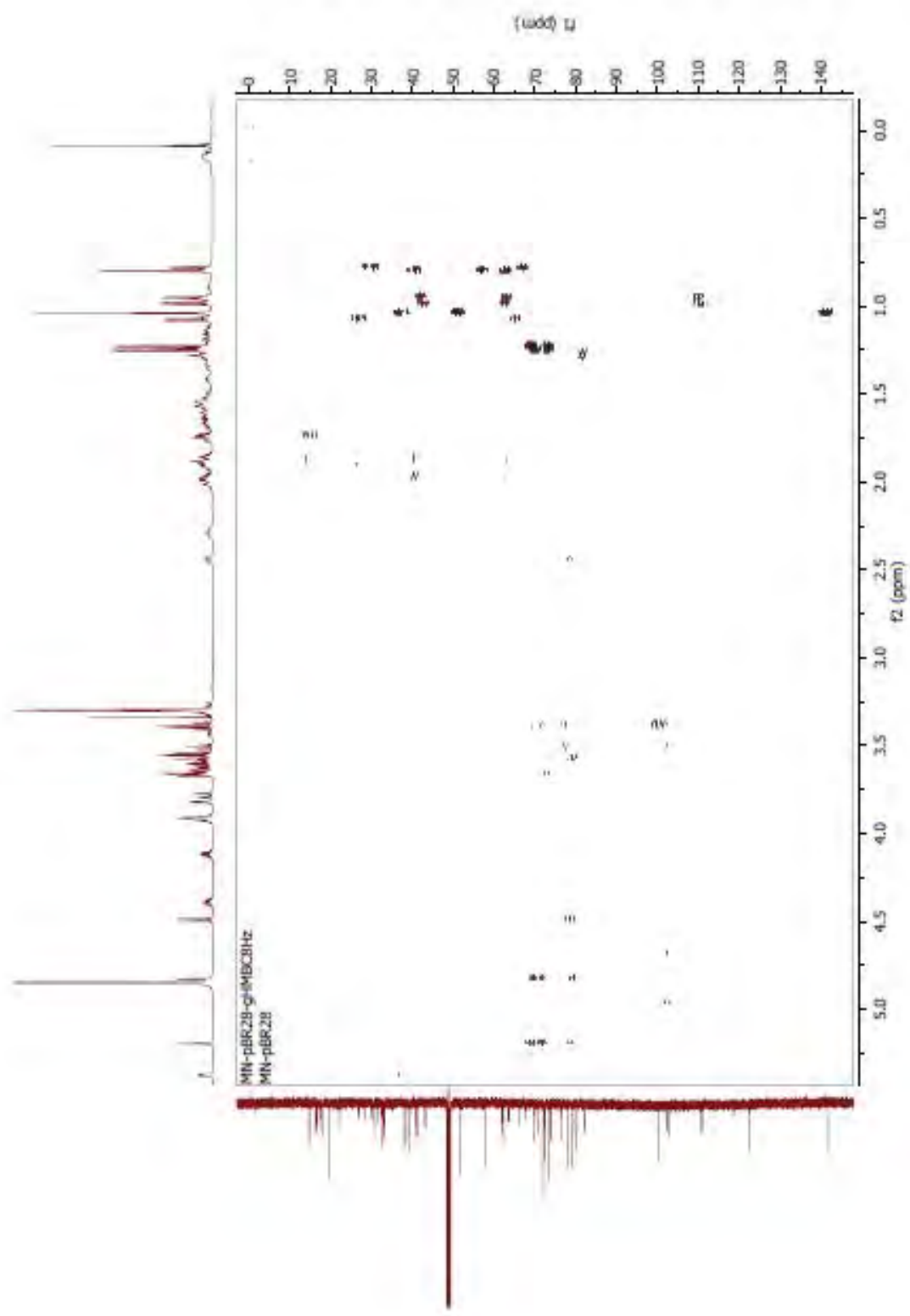


**Figura 2-C.** Mapa de contorno de gCOSY do composto codificado como MN-pBR28 e identificado como uma saponina esteroidal derivada da bioconversão microbiana da metil-protodioscina.



**Figura 2-D.** Mapa de contorno de gHSQC do composto codificado como MN-pBR28 e identificado como uma saponina esteroideal derivada da bioconversão microbiana da metil-protodioscina.





**Figura 2-E.** Mapa de contorno de gHMBCHz do composto codificado como MN-pBR28 e identificado como uma saponina esteroideal derivada da bioconversão microbiana da metil-protodioscina.