**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

**Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de citros
atingidas pelo glyphosate**

Renan Gravena

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Fitotecnia.**

**Piracicaba
2006**

Renan Gravena
Engenheiro Agrônomo

**Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de citros
atingidas pelo glyphosate**

Orientador:
Prof. Dr. RICARDO VICTORIA FILHO

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Fitotecnia.**

Piracicaba
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Gravena, Renan

Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de citros atingidas pelo
glyphosate / Renan Gravena. - - Piracicaba, 2006.
144 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Aminoácido 2. Etileno 3. Fenol 4. Fruta cítrica 5. Herbicida 6. Toxicidade
I. Título

CDD 634.3

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha Família,

exemplo de dedicação, amor e confiança,

Dedico

À minha esposa Adriana e meu filho Henrique,

pelo amor, carinho e compreensão,

Ofereço

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ricardo Victoria Filho pela dedicação, orientação, confiança e distinto exemplo que contribuíram de forma relevante não só na execução deste trabalho, mas principalmente em meu desenvolvimento profissional;

Ao Prof. Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Jaboticabal-SP, pela amizade e inestimável auxílio transferindo conhecimento, disponibilizando seu laboratório e viabilizando a integração com outros pesquisadores;

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera e à Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia (IB), Campinas-SP, pelos ensinamentos e auxílio na realização das análises bioquímicas deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Murilo de Melo e ao funcionário Antonio Francisco de Campos Amaral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, pelo apoio no início da condução da tese.

À Luciane Aparecida Lopes Toledo, secretária do Curso de Pós Graduação em Fitotecnia, pelo auxílio exemplar durante todo o curso.

A todos os funcionários do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em especial ao Luiz Ferrari e ao Aparecido Mendes pela presteza e dedicação com que sempre me ajudaram;

Ao Júlio Cesar Máximo, Gustavo Vilela Fracasso e à Dulcinéia Pereira de Souza pelo auxílio na execução das avaliações.

A todos os funcionários e amigos da Gravena Ltda, pelo auxílio direto ou indireto, sem o qual não seria possível a realização desta tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de auxílio.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
Referências.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Características gerais do glyphosate.....	15
2.2 Comportamento do glyphosate no solo.....	16
2.2.1 Sorção.....	16
2.2.2 Mobilidade.....	18
2.2.3 Degradação.....	19
2.3 Comportamento do glyphosate na planta.....	21
2.3.1 Absorção e translocação.....	21
2.3.2 Metabolismo e detoxificação.....	22
2.3.3 Mecanismo de ação.....	23
2.3.4 Efeitos secundários.....	24
2.4 Uso de glyphosate em citros.....	27
Referências.....	30
3 EFEITO DO GLYPHOSATE NAS CONCENTRAÇÕES DE CHIQUIMATO, AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS E FENÓIS E NA FOTOSSÍNTESE DE PLANTAS DE CITROS EM CONDIÇÕES CONTROLADAS.....	41
Resumo.....	41
Abstract.....	41
3.1 Introdução.....	42
3.2 Material e métodos.....	44
3.2.1 Ensaio com mudas de limão 'Cravo'.....	44
3.2.1.1 Instalação e condução.....	44
3.2.1.2 Tratamentos e delineamento experimental.....	45

3.2.1.3 Avaliações.....	46
3.2.1.3.1 Análises bioquímicas.....	46
3.2.1.3.2 Análises fotossintéticas.....	48
3.2.1.4 Análise dos dados.....	51
3.2.2 Ensaio com mudas de 'Valência' sobre 'Swingle'.....	51
3.2.2.1 Instalação e condução.....	51
3.2.2.2 Tratamentos e delineamento experimental.....	52
3.2.2.3 Avaliações.....	52
3.2.2.4 Análise dos dados.....	53
3.3 Resultados e discussão.....	53
3.3.1 Mudas de limão 'Cravo'.....	53
3.3.2 Mudas de 'Valência' sobre 'Swingle'.....	63
3.4 Conclusões.....	72
Referências.....	72
4 TOXICIDADE DE GLYPHOSATE EM PLANTAS NOVAS DE CITROS, RESULTANTE DE APLICAÇÃO CAULINAR OU FOLIAR.....	78
Resumo.....	78
Abstract.....	78
4.1 Introdução.....	79
4.2 Material e métodos.....	80
4.2.1 Instalação e condução.....	80
4.2.2 Tratamentos e delineamento experimental.....	82
4.2.3 Avaliações.....	83
4.2.3.1 Análises bioquímicas.....	83
4.2.3.2 Clorofila e fluorescência.....	84
4.2.3.3 Crescimento das plantas.....	85
4.2.4 Análise dos dados.....	86
4.3 Resultados e discussão.....	86
4.4 Conclusões.....	98
Referências.....	99

5 QUEDA DE FRUTOS DE LARANJA 'PERA' ATINGIDOS PELO HERBICIDA GLYPHOSATE.....	104
Resumo.....	104
Abstract.....	104
5.1 Introdução.....	105
5.2 Material e métodos.....	106
5.2.1 Instalação e condução.....	106
5.2.2 Experimento I - Queda de frutos em função da aplicação de glyphosate dirigida ao terço basal das plantas.....	106
5.2.3 Experimento II - Queda de frutos em função da aplicação de glyphosate dirigida aos frutos e/ou folhas.....	109
5.2.4 Experimento III - Produção de etileno em frutos devido à aplicação de glyphosate.....	109
5.2.5 Análise dos dados.....	112
5.3 Resultados e discussão.....	112
5.3.1 Experimento I - Queda de frutos em função da aplicação de glyphosate dirigida ao terço basal das plantas.....	112
5.3.2 Experimento II - Queda de frutos em função da aplicação de glyphosate dirigida aos frutos e/ou folhas.....	117
5.3.3 Experimento III - Produção de etileno em frutos devido à aplicação de glyphosate.....	118
5.3.4 Considerações gerais.....	119
5.4 Conclusões.....	120
Referências.....	121
6 TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE LARANJA 'PERA' AO GLYPHOSATE EM FUNÇÃO DA APLICAÇÃO ACIDENTAL COM PULVERIZADOR TRATORIZADO.....	125
Resumo.....	125
Abstract.....	125
6.1 Introdução.....	126
6.2 Material e métodos.....	127

6.2.1 Localização e condução do estudo.....	127
6.2.2 Tratamentos e delineamento experimental.....	128
6.2.3 Aplicação dos tratamentos.....	129
6.2.4 Avaliações.....	129
6.2.4.1 Caracterização da pulverização.....	129
6.2.4.2 Análises bioquímicas.....	130
6.2.4.3 Clorofila e fluorescência.....	132
6.2.4.4 Fitointoxicação e produção de Frutos.....	133
6.2.5 Análise dos dados.....	134
6.3 Resultados e discussão.....	134
6.4 Conclusões.....	141
Referências.....	141

RESUMO

Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de citros atingidas pelo glyphosate

O objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento fisiológico e bioquímico de plantas de citros (*Citrus* spp.) submetidas à aplicação do herbicida glyphosate. Para tanto, foram realizados quatro estudos. No primeiro, avaliou-se o efeito de glyphosate (doses entre 0 e 720 g e.a.ha⁻¹, aplicadas sobre a parte aérea das plantas) nas concentrações foliares de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenóis e na fotossíntese de plantas de citros em condições controladas. Foram testadas mudas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* L. Osbeck), com 4 meses de idade, e mudas de 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) sobre 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus paradisi* Macf), com 24 meses de idade. No segundo estudo avaliou-se, em condições de campo, a toxicidade de glyphosate em plantas submetidas à aplicação atingindo o caule (doses entre 0 e 2160 g e.a.ha⁻¹) ou toda a parte aérea (doses entre 0 e 720 g e.a.ha⁻¹). Os materiais vegetais testados foram plantas de laranja 'Valência' sobre 'Swingle' e limão 'Cravo', com 20 e 27 meses de idade, respectivamente. No terceiro avaliou-se a queda de frutos de laranjeira 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) em função do glyphosate. No último estudo investigou-se a possibilidade de aplicação acidental simulada de glyphosate causar intoxicação e queda de frutos em plantas de laranja 'Pera'. No primeiro estudo verificou-se efeito de glyphosate somente nas concentrações de chiquimato e aminoácidos livres totais das mudas de limão 'Cravo'; porém, os efeitos foram transitórios. Não houve efeito nos conteúdos de fenóis e clorofila total e na atividade fotossintética. Não se constatou qualquer efeito nas características bioquímicas e na fotossíntese das mudas de 'Valência', indicando significativa tolerância ao herbicida. No estudo a campo, as plantas de citros atingidas pelo glyphosate no caule não sofreram intoxicação. Apenas a aplicação nas doses de 360 e 720 g e.a.ha⁻¹ sobre a parte aérea afetou as plantas. O principal sintoma de intoxicação consistiu na emissão de brotações deformadas, indicando efeito nas regiões meristemáticas. Os efeitos nas folhas pré-formadas foram pequenos ou inexistentes. Todas as plantas atingidas pelo herbicida se recuperaram entre seis e doze meses após a aplicação. Nos estudos para avaliar a queda de frutos observou-se que o glyphosate promove a produção de etileno, causando a queda destes quando estão em fase final de maturação. A queda ocorreu principalmente devido ao contato direto com a pulverização e não devido à translocação do herbicida. No último estudo, constatou-se que a aplicação acidental simulada foi parcialmente interceptada pelo mato, não causando efeito significativo na queda de frutos e no desenvolvimento vegetativo das plantas de citros.

Palavras-chave: *Citrus* spp.; herbicida; toxicidade; chiquimato; aminoácidos; fenóis; escoparone; etileno.

ABSTRACT

Biochemical and physiological citrus plants responses under glyphosate application

The objective of this research was to evaluate physiological and biochemical responses of citrus (*Citrus* spp.) plants sprayed with the herbicide glyphosate. Four studies were done to attain this objective. By the first one, it were investigated the effects of glyphosate (dosages from 0 to 720 g a.e.ha⁻¹ applied on plants canopies) on the leaf contents of shikimate, total free amino acids and phenolic compounds, and on photosynthesis of citrus plants under controlled conditions. The experiments were conducted using 'Rangpur Lime' (*Citrus limonia* L. Osbeck) rootstock, with 4 months old, and 'Valencia' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) scion grafted on 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus paradisi* Macf) rootstock, with 24 months old. By the second trial, it was evaluated, under field conditions, the toxicity of glyphosate on citrus plants sprayed directly to the the trunk (dosages from 0 to 2160 g a.e.ha⁻¹) or on the canopy (dosages from 0 to 720 g a.e.ha⁻¹). The plants tested were 'Valencia' var. grafted on 'Swingle' var. and on 'Rangpur Lime' var., with 20 and 27 months old, respectively. By the third trial, it was evaluated the fruit dropping of 'Pera' var. (*Citrus sinensis* L. Osbeck) in relation to glyphosate spray. The last trial was conducted to evaluate if an accidental simulated spray of glyphosate can cause toxicity and fruit dropping in 'Pera' citrus var. The results by the first study showed effects of glyphosate only on shikimate and total free amino acids contents of 'Rangpur Lime' seedlings. However, these effects were temporaries. No effect was found on phenolic compound contents and on the photosynthetic characteristics evaluated. It was not postrayed any effect on biochemical and photosynthetic characteristics of the 'Valencia' plants, indicating significant glyphosate tolerance. By the second study, the citrus plants sprayed with glyphosate on their trunks have not showed intoxication. Only the application of glyphosate at dosages of 360 and 720 g a.i.ha⁻¹ on the canopies affected the plants. The main toxic symptoms consisted of deformation of new flushes, indicating effect on plant meristems. The effects of glyphosate were low or none in the mature leaves. All plants sprayed by glyphosate have been recovered by from six to twelve months after the application. In the study, in order to evaluate the fruit dropping, it was found that the herbicide glyphosate induced ethylene production, causing fruit dropping when they are in final phase of ripening. Fruit dropping occurred mainly due to the direct contact of the spraying instead of the herbicide translocation. By the last study it was found that the accidental simulated spraying is partially intercepted by weeds, do not causing significant effect on fruit dropping and citrus growth.

Key-word: *Citrus* spp.; herbicide; toxicity; shikimate; amino acids; phenolic compounds; scoparone; ethylene.

1 INTRODUÇÃO

O glyphosate [n-(fosfonometil)glicina] é um dos principais herbicidas comercializados no mundo, sendo utilizado em mais de 119 países, em ambientes agrícolas, florestais, aquáticos, industriais e residências (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). No Brasil, é recomendado para o controle de mais de 150 espécies de plantas daninhas, incluindo plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas de ciclo anual ou perene (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Consiste no herbicida mais utilizado na citricultura, sendo comum a realização de três ou mais aplicações durante o ano, direcionadas às linhas de plantio, sob as copas das plantas. Em culturas perenes, é recomendado que a sua aplicação não atinja as folhas e as partes verdes das plantas, devido à ausência de seletividade (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

Estudos com vários anos consecutivos utilizando o glyphosate no controle de plantas daninhas, em comparação a outros herbicidas ou métodos de controle, não apresentaram qualquer efeito negativo sobre a produtividade das plantas de citros (CARVALHO et al., 2002; TERSI, 2001; VICTORIA FILHO, 1983). No entanto, eventualmente, é comum ocorrer aplicações acidentais de glyphosate sobre as folhas das plantas, resultando em intoxicação.

Alguns trabalhos já foram conduzidos para avaliar os danos causados por aplicações acidentais de glyphosate, principalmente durante a década de 1970, logo após a introdução comercial deste herbicida. Tucker (1977) observou que plantas novas podem exibir diferentes graus de toxidez, variando em função da idade, local de aplicação na planta, maturidade do tecido e dose do herbicida. Os sintomas, quando constatados, incluem a desfolha, morte de ramos e malformação de rebrotas. Toth e Morrison (1977) observaram que em condições de campo os sintomas de intoxicação de plantas novas podem persistir até dois anos após a aplicação do herbicida. Erickson (1996) e Tucker (1977) constataram que os frutos em fase final de maturação são bastante suscetíveis ao glyphosate, podendo sofrer abscisão precoce.

Os trabalhos em citros limitam-se à identificação e quantificação dos sintomas visuais de intoxicação. Entretanto, o mecanismo de ação do glyphosate faz com que seja importante conhecer melhor seu efeito nas plantas. Este herbicida atua inibindo a

enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), afetando a via metabólica do chiquimato, que é responsável pela produção dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (COLE, 1985). Estes aminoácidos são essenciais para a síntese protéica, mas também servem de substrato para a produção de vários compostos secundários de grande importância nas plantas, tais como as antocianinas, ligninas, fitoalexinas e promotores de crescimento (COLE, 1985; GRUYS; SIKORSKI, 1999; HAHLBROCK; SCHEEL, 1989; WHETTEN; SEDEROFF, 1995).

O objetivo deste trabalho foi investigar comportamento fisiológico e bioquímico de plantas de citros submetidas à aplicação de glyphosate. Para tanto, foram realizados quatro estudos com os seguintes objetivos específicos:

- Investigar os efeitos do glyphosate nas concentrações de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenóis e na fotossíntese de plantas de citros, em condições controladas;
- Avaliar a toxicidade do glyphosate em plantas novas de citros, quando aplicado atingindo o caule ou a parte aérea, em condições de campo;
- Avaliar os efeitos do glyphosate na queda dos frutos de citros e a relação entre a queda e a produção de etileno;
- Verificar a possibilidade de aplicação acidental simulada do glyphosate causar intoxicação e queda de frutos de plantas de citros.

Referências

CARVALHO, J.E.B.; SOUZA, L.S.; CALDAS, R.C.; ANTAS, P.E.U.T.; ARAÚJO, A.M.A.; LOPES, L.C.; SANTOS, R.C.; LOPES, N.C.; SOUZA, A.L.V. Leguminosa no controle integrado de plantas daninhas para aumentar a produtividade da laranja-‘Pêra’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.82-85, 2002.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate – a literature analysis. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.48-74.

ERICKSON, C. G. Management of glyphosate-related citrus fruit drop. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v.109, p.40-42, 1996.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate**: a unique global herbicide. Washington: ACS monograph, 1997. 653p.

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.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.40, p.347-369, 1989.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: IAPAR, 2005. 592p.

TERSI, F.E.A. **Avaliação de métodos de manejo do solo e de plantas daninhas em um pomar de laranja Valência**. 2001. 78p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2001.

TOTH, J.; MORRISON, G. Glyphosate drift damages fruit trees. **Agricultural Gazette of New South Wales**, Sydney, v.88, p.44-45, 1977.

TUCKER, D.P.H. Glyphosate injury symptom expression in citrus. **HortScience**, Alexandria, v.12, n.5, p. 498-500, 1977.

VICTORIA FILHO, R. **Efeitos do uso contínuo de herbicidas no desenvolvimento, produção e qualidade dos frutos de dois cultivares de citros (*Citrus sinensis* (L.) Orbeck).** 1983. 232p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, Rockville, v.7, p.1001-1013, 1995.

De forma generalizada, o herbicida glyphosate pode ser definido como sendo não seletivo às culturas, de ação sistêmica nas plantas daninhas e sem efeito residual no solo (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

2.2 Comportamento do glyphosate no solo

2.2.1 Sorção

O glyphosate é caracterizado por apresentar alta capacidade de sorção às partículas coloidais do solo, com elevada energia de ligação, sendo pouco dessorvido (CHEAH; KIRKWOOD; LUM, 1997; NOMURA; HILTON, 1977; SPRANKLE; MEGGIT; PENNER, 1975a,b). Dessa forma, este herbicida, após entrar em contato com o solo, tende a permanecer indisponível para a absorção pelas plantas (SPRANKLE; MEGGIT; PENNER, 1975a). Resultados de pesquisa mostram que quando a aplicação do glyphosate é dirigida somente ao solo, não são constatados danos visuais nas plantas de citros (TUCKER, 1977). Prata (2002) verificou que plantas de *Panicum maximum* crescendo em Latossolo Vermelho Distroférrico somente apresentaram sintomas de intoxicação em doses pelo menos 10 vezes superiores às recomendadas. Hance (1976), com base em estudos hidropônicos em diferentes culturas anuais, sugere que a baixa atividade do glyphosate no solo não deve estar relacionada somente com a sorção às partículas coloidais, mas também com a baixa capacidade intrínseca do sistema radicular de determinadas plantas em absorver o produto.

Mesmo sendo caracterizado por permanecer fortemente ligado às partículas do solo, não apresentando efeito tóxico às plantas, existem relatos na literatura indicando que em situações específicas o glyphosate pode permanecer ativo no solo por um curto período de tempo, afetando a emergência de culturas anuais e plantas daninhas (KAWATE; APPLEBY, 1987; RODRIGUES; WORSHAM; CORBIN, 1982; SALAZAR; APPLEBY, 1982). Esses resultados indicam que a disponibilidade do glyphosate no solo pode ocorrer principalmente em função da combinação dos seguintes fatores: solo com textura arenosa, alta dose do herbicida (acima de 3,4 kg e.a.ha⁻¹), disponibilidade de água e alto valor de pH do solo.

O principal mecanismo de ligação do glyphosate às partículas coloidais do solo é semelhante ao que ocorre com fosfatos inorgânicos. Neste caso, um oxigênio do grupo metilfosfônico do herbicida pode formar ligação covalente dativa com os átomos dos sesquióxidos do solo (JONGE et al, 2001). Vários trabalhos na literatura têm demonstrado que a retenção do glyphosate é diretamente proporcional à capacidade do solo em adsorver fosfato inorgânico, confirmando a importância deste mecanismo de ligação (GERRITSE; BELTRAN; HERNANDEZ, 1996; GLASS, 1987; HANCE, 1976; JONGE et al., 2001; MILES; MOYE, 1988). No entanto, solos não oxídicos também têm apresentado elevados coeficientes de sorção para este herbicida (NOMURA; HILTON, 1977; PRATA, 2002), evidenciando que outros mecanismos de sorção também são importantes na retenção do glyphosate.

A adsorção do glyphosate ao solo aumenta significativamente com o aumento do conteúdo de argila (GLASS 1987; McCONNELL; HOSSNER, 1985; MILES; MOYE 1988). Os resultados na literatura quanto à afinidade do glyphosate aos diferentes tipos de argila têm sido ambíguos e podem ser em parte consequência de diferentes valores de pH na solução e da composição iônica na superfície das argilas (MAcCONNEL; HOSSNER, 1985). McConnell e Hossner (1985); e Sprankle; Meggit e Penner (1975b) constataram que o glyphosate pode se ligar aos cátions extraíveis das argilas e que cátions com carga maior apresentaram maior afinidade ao glyphosate. Sprankle; Meggit e Penner (1975b) observaram comportamento semelhante para a matéria orgânica.

Miles e Moye (1988) estudaram a extração do glyphosate em solos e minerais de argila e verificaram que a extração foi maior com o aumento do pH e da força iônica da solução extratora. Dessa forma, sugeriram que ligações eletrostáticas e pontes de hidrogênio estão relacionadas à sorção do glyphosate. Quase todos os minerais avaliados apresentavam cargas permanentes, assim, em função do caráter zwitteriônico, as moléculas do herbicida podem apresentar uma carga negativa e uma positiva na presença de baixos valores de pH, possibilitando a sorção por ligação eletrostática com os minerais de argila de carga permanente. Por outro lado, com o aumento do pH, maior é a carga líquida negativa do glyphosate, podendo prejudicar a sorção. Nicholls e Evans (1991) obtiveram resultados parecidos e também atribuíram os efeitos do pH ao caráter zwitteriônico do herbicida.

Piccolo; Celano e Conte (1996) verificaram importante contribuição das substâncias húmicas na capacidade de sorção do glyphosate ao solo. Os autores constataram que a sorção do herbicida está relacionada com o tamanho molecular e a estrutura das substâncias húmicas. Para moléculas húmicas de maior massa molecular e com cadeias carbônicas mais alifáticas, os valores de coeficientes de sorção foram maiores. Como conclusão, os autores sugeriram as ligações de hidrogênio como o principal mecanismo de ligação, fundamentando-se no fato das moléculas de glyphosate possuírem grupos que podem servir como doadores e receptores de prótons e as substâncias húmicas possuírem grupos funcionais contendo oxigênio.

O comportamento do glyphosate em solos brasileiros, dois oxídicos (Nitossolo Vermelho Eutroférico e Latossolo Amarelo Ácrico) e um não oxídico (Gleissolo), foi avaliado por Prata (2002). O autor constatou que a sorção do glyphosate foi extremamente alta para os três tipos de solos. Para o solo com baixo conteúdo de óxidos metálicos a matéria orgânica teve maior importância na sorção do herbicida. Também foi constatado que o glyphosate compete com os fosfatos inorgânicos, entretanto, esta competição somente passa a ser importante quando os níveis de P são extremamente altos, níveis estes que não ocorrem em condições de campo. Constatou-se menor efeito dos níveis de P na redução da sorção do solo que apresentava menor conteúdo de óxidos. Esses resultados são coerentes com as constatações existentes na literatura de que a formação de complexos com os óxidos do solo é de grande importância para a sorção do glyphosate, embora outros mecanismos de sorção também devam ocorrer especialmente em solos não oxídicos.

2.2.2 Mobilidade

O transporte de pesticidas no solo é governado pelos processos de sorção, transformação e absorção radicular das moléculas, aliados às condições ambientais. Assim, as propriedades físico-químicas das moléculas e os atributos físicos, químicos e biológicos do solo refletem diretamente na movimentação das moléculas no perfil do solo (BOUCHARD; ENFIELD; PIWONI, 1989).

Os dados de vários trabalhos de pesquisa indicam que o glyphosate apresenta pequena propensão para lixiviação (EDWARDS; TRIPLETT; KRAMER, 1980; RUEPPEL et al., 1977; SOUZA et al, 1999a; SPRANKLE; MEGGIT; PENNER, 1975b), concordando com o fato de o herbicida possuir elevada capacidade de sorção. Num estudo conduzido por Jonge; Jonge e Jacobsen (2000), o glyphosate radiomarcado na solução percolada de colunas preenchidas com amostras indeformadas de um solo arenoso variou proporcionalmente com a turbidez da solução, indicando que a molécula foi lixiviada provavelmente na forma de resíduo-ligado. Roy et al. (1989) estudaram a mobilidade do glyphosate em condições de campo. Um solo arenoso foi escolhido como padrão para avaliar a lixiviação e um solo argiloso para o escoamento superficial. O herbicida apresentou baixa capacidade de lixiviação nas condições estudadas e até uma declividade de 8° não foi constatado seu movimento lateral, seja por escoamento superficial ou fluxo subsuperficial.

A volatilização é um dos processos mais importantes na mobilidade de alguns herbicidas, tais como 2,4-D, mas não tem importância para o glyphosate, devido à baixa pressão de vapor de sua molécula (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997).

2.2.3 Degradação

Em soluções ou solos estéreis a degradação química do glyphosate é praticamente desprezível (RUEPPEL et al., 1977; SPRANKLE; MEGGIT; PENNER, 1975a,b). Quanto à decomposição fotoquímica, os resultados existentes na literatura são divergentes, entretanto, muitos trabalhos têm indicado que a degradação fotoquímica contribui muito pouco para a degradação do glyphosate no solo (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997).

A degradação microbiana é a rota principal pela qual o glyphosate é degradado no meio ambiente (RUEPPEL et al., 1977; SPRANKLE; MEGGIT; PENNER, 1975b; TORSTENSSON, 1985). O processo predominante é o co-metabolismo, portanto, os microorganismos não utilizam o herbicida para seu crescimento (NOMURA; HILTON, 1977; SPRANKLE; MEGGIT; PENNER, 1975b). Entretanto, existem relatos que

mostram que os microorganismos também utilizam a molécula de glyphosate como fonte carbono para seu crescimento (SOUZA et al, 1999b).

A principal via de biodegradação do glyphosate envolve a clivagem da molécula, produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). Estudos indicam que a degradação do glyphosate pode resultar na liberação de amônia, fosfato e CO₂ (RUEPPEL et al., 1977; SPRANKLE; MEGGIT; PENNER, 1975b). Outra via para degradação do glyphosate no solo é pela clivagem da ligação C-P de glyphosate, por ação da enzima C-P liase, produzindo sarcosina (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997).

Geralmente, a taxa de metabolismo do glyphosate no solo é inicialmente rápida, mas, posteriormente, é seguida por um lento e prolongado período de degradação (MOSHIER; PENNER, 1978; NOMURA; HILTON, 1977;). Nomura e Hilton (1977) sugerem que a fase inicial rápida representa a degradação do glyphosate livre ou facilmente disponível no solo e que a fase lenta pode ser em função da demorada liberação do glyphosate ligado. Eberbach (1998) observou rápida degradação do glyphosate no primeiro dia da aplicação no solo, seguida de diminuição até o quadragésimo dia. Segundo o autor, a influência da adsorção restringiu a disponibilidade do glyphosate para biodegradação ao longo do tempo.

Quando os herbicidas são aplicados repetidamente no solo por vários anos podem ter sua taxa de degradação aumentada em relação aos solos sem a aplicação do produto, pois os microrganismos presentes podem estar mais adaptados à presença do composto e apresentar enzimas específicas para metabolizá-lo. Robertson e Alexander (1994) conduziram estudo para avaliar a ocorrência de degradação acelerada de alguns herbicidas e observaram que o glyphosate foi rapidamente mineralizado após a segunda aplicação no solo.

Prata (2002) avaliou a persistência do glyphosate num Latossolo Vermelho Distroférico conduzido no sistema de plantio direto ou convencional e observou que a meia-vida de mineralização variou entre 252,6 e 782,1 dias e a meia-vida de dissipação entre 14,5 e 25,8 dias. A persistência do herbicida foi maior no plantio convencional. Os valores de meia-vida de mineralização observados na literatura para o glyphosate variam de 19,2, para solos arenosos (CHEAH; KIRKWOOD; LUM, 1998), a 22,7 anos,

para solos vulcânicos com elevado grau de sorção (NOMURA; HILTON, 1977). Os valores de meia vida de dissipação encontrados na literatura também têm sido bastante variados (CHEAH; KIRKWOOD; LUM, 1998; EBERBACH, 1998; SMITH; AUBIN, 1993), mas, de forma geral, encontram-se próximos aos valores encontrados por Prata (2002).

2.3 Comportamento do glyphosate na planta

A ação dos herbicidas ocorre através de duas fases: (i) a primeira envolve o movimento do herbicida ao local de ação e (ii) a segunda envolve as consequências metabólicas resultantes da interação com o local de ação (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993). A primeira fase inicia-se com a aplicação do herbicida para controlar a planta, seja de forma direta sobre a folhagem ou via solo para atingir as raízes. O herbicida pode ser então absorvido pela planta, seguindo uma série de etapas, até atingir o local de ação. Essas etapas incluem a entrada nas células, difusão por curtas distâncias, transporte por longas distâncias, conversão metabólica do herbicida (causando ativação ou desativação) e entrada nas organelas celulares. A interação do herbicida com o local de ação pode ser considerada como a primeira etapa da segunda fase. A interação com o local de ação proporciona uma série de consequências tóxicas que resulta na morte da planta.

2.3.1 Absorção e translocação

A absorção e translocação do glyphosate são influenciadas por diversos fatores, incluindo as características da planta, as condições ambientais, a concentração do herbicida, o surfatante utilizado e o método de aplicação. Os efeitos de tais fatores já foram extensivamente estudados e muitos dos resultados são encontrados nas revisões feitas por Caseley e Coupland (1985) e Franz; Mao e Sikorski (1997).

A absorção do glyphosate é um processo que envolve uma rápida penetração inicial através da cutícula, seguida por uma absorção lenta. A difusão é considerada o principal processo de transporte do glyphosate pela cutícula e, portanto, o gradiente de concentração entre a região de deposição e o interior da planta influencia a absorção

(CASELEY; COUPLAND, 1985). A absorção do glyphosate normalmente aumenta com a redução no volume de aplicação e aumento de sua concentração (STAHLMAN; PHILLIPS, 1979; TOWNSON; BUTLER, 1990). A molécula do glyphosate é altamente polar e apresenta baixa lipofilicidade, com um coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) próximo a -4. Devido a estas características, é possível que a passagem do glyphosate da superfície da folha para o apoplasto ocorra em função de um caminho aquoso ou hidrofílico através da cutícula lipofílica (CASELEY; COUPLAND, 1985).

Os principais componentes químicos das ceras epicuticulares são os n-alcenos, ésteres, álcoois e ácidos graxos (BAKER, 1982). A cutícula é primariamente apolar, mas existem diferenças com relação ao grau de hidrofobicidade devido à sua composição. Essas diferenças podem refletir na absorção do glyphosate, resultando em menor eficiência do produto quando a cutícula é mais hidrofóbica (CHACHALIS; REDDY; ELMORE, 2001).

Após atingir o apoplasto, o glyphosate é absorvido pelas células por um processo que pode ser complexo, envolvendo mais de um mecanismo. Resultados obtidos por Hetherington et al. (1998) evidenciam que quando o herbicida está em baixas concentrações no apoplasto um mediador ativo é responsável por sua absorção, provavelmente um transportador de fosfato, e em altas concentrações o processo predominante é a difusão.

Normalmente o glyphosate é rapidamente translocado pelas plantas. A via predominante de translocação é simplástica, entretanto, significativo movimento apoplástico também ocorre (CASELEY; COUPLAND, 1985). Vários trabalhos indicam que o glyphosate segue a mesma rota dos produtos da fotossíntese (açúcares), ocorrendo das folhas fotossinteticamente ativas em direção às partes das plantas que utilizam estes açúcares, estabelecendo-se uma relação de fonte e dreno (CASELEY; COUPLAND, 1985).

2.3.2 Metabolismo e detoxificação

Diversos trabalhos na literatura mostram que o glyphosate é pouco metabolizado nas plantas (COUPLAND, 1985). No entanto, resultados obtidos por Monquero et al.

(2004) mostram até 40% de metabolismo do herbicida para ácido aminometilfosfônico (AMPA) em plantas de *Commelina benghalensis*, indicando este como um provável mecanismo de tolerância desta planta daninha.

Os estudos com glyphosate radiomarcado em plantas possibilitam sugerir que primeiro o glyphosate é transformado em AMPA e depois em moléculas com dois átomos de carbono, provavelmente o glioxalato. O AMPA é degradado via transaminação, formando formil fosfonato, o qual se decompõe em formaldeído e fosfato inorgânico. O formaldeído pode ser incorporado diretamente a metabólitos naturais ou, após a decomposição a CO₂, através da fotossíntese (COUPLAND, 1985).

Nas plantas existem enzimas que apresentam a capacidade de metabolizar diversos xenobióticos, dentre eles, herbicidas, proporcionando desintoxicação. Uma das enzimas mais importantes, com esta característica, é a glutational S-transferase (GSTs, EC 2.5.1.18), que catalisa a conjugação de glutational (GSH) a uma variedade de substratos, geralmente citotóxicos, produzindo conjugados menos tóxicos (COLE, 1994; KREUZ; TOMMASINI; MARTINOIA, 1996; WILCE; PARKER, 1994). Vários autores constataram aumento da atividade desta enzima em plantas submetidas à aplicação de glyphosate, indicando que esta pode participar no processo de detoxificação do herbicida pelas plantas, podendo ter alguma influência na tolerância (CATANEO et al., 2003; UOTILA; GULLNER; KÖMIVES, 1995).

2.3.3 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação do glyphosate é atribuído à inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, E.C. 2.5.1.19), que catalisa a reação na qual chiquimato-3-fosfato (S3P) reage com fosfoenolpiruvato (PEP), formando 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e fósforo inorgânico (P_i) (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). Essa reação ocorre em duas etapas, sendo que inicialmente a enzima EPSPs se liga ao S3P, formando o complexo EPSPs-S3P, e posteriormente o PEP se encaixa nesse complexo, permitindo o prosseguimento da reação, produzindo EPSP. O glyphosate não se liga à enzima livre, mas ao complexo EPSPs-S3P, impedindo a ligação com PEP, formando o complexo inativo EPSPs-S3P-glyphosate

(DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993; HERRMANN, 1995). A molécula do herbicida se liga ao complexo EPSPs-S3P 115 vezes mais firmemente que PEP e apresenta dissociação 2300 vezes mais lenta (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997).

A EPSPs está presente em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais, o que explica a baixa toxicidade do glyphosate para mamíferos. Em plantas, essa enzima é codificada no núcleo e desempenha sua ação catalítica no cloroplasto. Após ser sintetizada no citoplasma, a enzima necessita estar ligada a um peptídeo de transito para dirigir-se ao cloroplasto, caracterizando uma forma conhecida como pré-enzima (pEPSPs). Na membrana do cloroplasto, a pré-enzima é recebida por um receptor, sendo que, posteriormente ocorre liberação da forma ativa da enzima no lado interno da membrana. A inibição do glyphosate pela enzima também parece ocorrer no citoplasma, formando o complexo glyphosate-pEPSPs-S3P. A estabilidade estrutural desse complexo impede a necessária flexibilidade para o transporte através da membrana do cloroplasto (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993; FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997).

2.3.4 Efeitos secundários

A inibição da enzima EPSPs afeta a via metabólica do chiquimato, que é responsável pela produção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Vários trabalhos demonstram que plantas tratadas com glyphosate tornam-se deficientes destes três aminoácidos aromáticos, sendo que a adição exógena destes metabólitos reverte a intoxicação (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). Estes três aminoácidos, além de serem necessários para a síntese protéica, servem de substrato para a produção de muitos outros compostos secundários, que, conseqüentemente podem ser afetados quando a planta é atingida pelo glyphosate (COLE, 1985; GRUYS; SIKORSKI, 1999; HAHLBROCK; SCHEEL, 1989; WHETTEN; SEDEROFF, 1995). Na literatura podem ser encontrados muitos efeitos secundários causados pelo glyphosate e estes variam em função de vários fatores, tais como a espécie, dose e estágio de desenvolvimento da planta. A seguir serão apresentados alguns dos efeitos mais relatados na literatura.

Uma série de estudos demonstram que a inibição da enzima EPSPs pelo glyphosate interfere no controle da entrada de carbono na rota do chiquimato pelo aumento da atividade da enzima 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), que catalisa a condensação de eritrose-4-fosfato com PEP, e é considerada enzima reguladora da rota (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993). O aumento da atividade da DAHPS aparentemente é devido aos baixos níveis de arogenato, que é um inibidor alostérico da DAHPS e é um composto posterior a EPSP na rota do chiquimato. Com a redução da inibição por arogenato, DAHPS continua atuando, o que provoca acúmulo de altos níveis de chiquimato, já que a rota é interrompida pela inibição da EPSPs. A quantidade de chiquimato que é acumulada pela desregulação da rota representa um forte dreno de carbono no ciclo de Calvin, pelo desvio de eritrose-4-fosfato, que seria empregado na regeneração de ribulose bifosfato. Isto representa um efeito importante da inibição do glyphosate, que reduz drasticamente a produção fotossintética (GEIGER; KAPITAN; TUCCI, 1986; GEIGER; TUCCI; SERVIATES, 1987; SERVIATES; TUCCI; GEIGER, 1987; SHIEH; GEIGER; SERVIATES, 1991).

A inibição da EPSPs pelo glyphosate causa o bloqueio da síntese dos aminoácidos aromáticos e dos fenóis derivados desses aminoácidos (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993). Relatos sobre os efeitos na síntese de fenóis específicos são numerosos, sendo que uma revisão detalhada foi realizada por Duke e Hoagland (1985). Os resultados indicam que o glyphosate pode aumentar a atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL), concomitantemente com o decréscimo na concentração de fenóis secundários, provavelmente devido a uma redução no controle da inibição da FAL (COLE; DODGE; CASELEY, 1980).

O acúmulo de chiquimato causado pela inibição da EPSPs e a desregulação da rota do chiquimato resulta no aumento de certos ácidos hidroxibenzóicos que aparentemente derivam diretamente do chiquimato (BECERRIL; DUKE; LYDON, 1989; CAÑAL; TAMÉS; FERNÁNDEZ, 1987; LYDON; DUKE, 1988). Segundo Devine; Duke e Fedtke (1993), o efeito no conteúdo de ácidos benzóicos é relativamente muito maior que o efeito no conteúdo de fenóis derivados dos aminoácidos aromáticos. Uma razão para a redução no conteúdo de fenóis derivados de aminoácidos aromáticos ser menor do que o esperado é que a rota metabólica tem acesso aos aminoácidos aromáticos

provenientes da degradação de proteínas e das reservas em vacúolos, assim como, aos aminoácidos recém formados (WANG, 2001).

Em doses sub-letais de glyphosate, os efeitos na concentração de fenóis em tecidos exportadores de carboidratos podem ser transitórios. Entretanto, os efeitos podem manter-se pronunciados em órgãos drenos como frutos e flores (BECERRIL; DUKE; LYDON, 1989). Isto ocorre em função do glyphosate ser muito móvel no floema, acumulando-se nos órgãos dreno (CASELEY; COUPLAND, 1985). Em função destas constatações pode-se considerar que os efeitos nos compostos secundários podem ocorrer somente na presença do herbicida.

Trabalhos demonstraram que doses não-letais do glyphosate inibem a produção de fitoalexinas derivadas da rota chiquímica de algumas plantas, aumentando a susceptibilidade a patógenos. As fitoalexinas são compostos antimicrobianos sintetizados pela planta que se acumulam nas células vegetais em resposta à infecção microbiana, limitando a propagação do patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1995). As fitoalexinas são sintetizadas em diferentes vias metabólicas que podem ou não atuar conjuntamente: rota do acetato-mevalonato; rota do acetato-malonato; e rota do chiquimato (HAMMERSCHMIDT, 1999). Outro efeito atribuído ao glyphosate na supressão da defesa das plantas contra patógenos é pela redução na lignificação dos tecidos durante a infecção (LIU; PUNJA; RAHE, 1997).

Keen; Holliday e Yoshikawa (1982) constataram que o uso de sub-doses de glyphosate afetou a expressão da resistência de soja a *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, pela redução no acúmulo de gliceolina. O efeito do glyphosate foi mais intenso quando aplicado junto com a inoculação do patógeno. A aplicação às 23 horas após a inoculação afetou menos a reação da planta contra a doença. Holliday e Keen (1982) verificaram que os efeitos do glyphosate na produção de gliceolina em soja são reduzidos com o fornecimento de fenilalanina e tirosina. Johal e Rahe (1990) relataram a inibição no acúmulo de fitoalexinas pelo glyphosate em plantas de feijão afetando a expressão da resistência ao patógeno *Colletotricum lindemuthianum*. Estes autores observaram que condições adversas às reservas do aminoácido fenilalanina, como a exposição à luz e a retirada dos cotilédones, favorecem o efeito negativo do glyphosate na supressão da produção de fitoalexinas. A aplicação do glyphosate entre 48 horas

antes e 96 horas após a inoculação impediu a expressão de resistência pelas plantas. Aplicações após este período tiveram efeito reduzido, até não ser mais constatado quando a aplicação ocorreu às 130 horas após a inoculação. Sharon; Amsellem e Gressel (1992) mostram que o glyphosate aplicado em dose sub-letal, juntamente com conídios do fungo *Alternaria cassiae*, inibe a produção e o acúmulo de fitoalexina em *Senna obtusifolia* (fedegoso), logo às 24 horas após a aplicação, favorecendo o desenvolvimento da doença.

Embora sejam importantes os relatos mostrando os efeitos do glyphosate na produção de fitoalexinas e, conseqüentemente, na supressão da resistência das plantas contra doenças (HOAGLAND, 1996), também existem relatos contraditórios, mostrando a ausência desta relação. Lee; Penner e Hammerschmidt (2003) obtiveram resultados diferentes aos de Keen; Holliday e Yoshikawa (1982), não observando decréscimo na produção de gliceolina e favorecimento na incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja convencional e transgênica resistente ao glyphosate. Estes resultados foram consistentes com os obtidos por Lee; Penner e Hammerschmidt (2000). Liu; Punja e Rahe (1995) verificou efeito positivo do glyphosate no acúmulo da fitoalexina faseolina em feijão, após à infecção por *Pythium* spp. No entanto, estes mesmos autores sugeriram em pesquisa posterior que a infecção por *Pythium* spp. em feijão pode ser favorecida pelo glyphosate devido à redução na produção de lignina e estímulo na germinação e crescimento dos propágulos do patógeno no solo via exudados da planta. Berner; Berggren e Snow (1991), em contrapartida, constataram efeito fungicida do glyphosate em pré-plantio da cultura da soja, reduzindo a posterior incidência de doenças na cultura. Wyss e Müller-Schärer (2001), selecionando herbicidas para melhorar a eficiência do patógeno *Puccinia lagenophora* no biocontrole de plantas de *Senecio vulgaris*, descartaram o uso do glyphosate logo nos estudos preliminares devido ao significativo efeito negativo do herbicida na germinação de esporos do patógeno, mesmo em doses extremamente baixas.

2.4 Uso de glyphosate em citros

Na cultura dos citros, os métodos de controle existentes são, basicamente, o preventivo, cultural, mecânico, físico, biológico e químico (DURIGAN; TIMOSSO, 2002; GELMINI; NOVO; NEGRI, 1998; VICTORIA FILHO, 1998). Na literatura podem ser encontrados vários trabalhos nos quais são comparadas as vantagens e desvantagens de alguns desses métodos de controle, aplicados de forma associada ou não, visando o manejo das plantas daninhas na linha e entrelinha de pomares de citros (CARVALHO; PAES; MENEGUCCI, 2001; CARVALHO et al., 2002; SÃO JOSÉ, 1988; TERSI; SOUZA; RIGOLIN, 1999; TERSI, 2001; VICTORIA FILHO, 1983).

Quando o controle é realizado nas linhas de plantio, normalmente, tem-se o objetivo de minimizar a competição da cultura com as plantas daninhas e evitar o crescimento das plantas de grande porte ou trepadeiras que podem afetar os tratos culturais e a colheita. Por outro lado, quando o controle é nas entrelinhas, o objetivo pode ser diferente, pois, vários trabalhos na literatura indicam vantagens econômicas e ambientais quando é preconizada a preservação da vegetação nas entrelinhas, seja ela espontânea ou cultivada (CARVALHO; PAES; MENEGUCCI, 2001; SILVA; DONADIO; CARLOS, 1999).

O controle das plantas daninhas na linha de plantio pelos produtores brasileiros é tradicionalmente feito com herbicidas aplicados em pós-emergência, sem efeito residual no solo, principalmente o glyphosate. No uso deste herbicida recomenda-se que as partes verdes das plantas não sejam atingidas, caso contrário pode ocorrer intoxicação, conforme descrito por Tucker (1977); Toth e Morrison (1977) e Erickson (1996). No entanto, quando são seguidas as recomendações normais do herbicida, trabalhos de longo prazo não demonstram efeitos negativos do herbicida.

Tersi; Souza e Rigolin (1999) avaliaram os efeitos de diferentes tratamentos com e sem glyphosate em um pomar de 'Valência' enxertada em limão 'Cravo'. Os tratamentos foram: (1) aplicação de glyphosate na linha e roçadeira na rua, (2) glyphosate na linha e grade na rua, (3) glyphosate na linha e na rua, (4) grade na linha e na rua, (5) roçadeira na linha e na rua, (6) rotativa na linha e grade na rua e (7) testemunha sem controle. O efeito na produção somente foi observado no quarto ano consecutivo de aplicação dos tratamentos, com o pomar apresentando seis anos de idade. Exceto pela redução da produção de frutos na testemunha, não foram

constatadas diferenças significativas entre os demais tratamentos. O crescimento da planta e os índices tecnológicos (quilogramas de sólidos solúveis por caixa, caixas por tonelada e frutos por caixa) não foram afetados pelos diferentes tratamentos. O teor foliar de nitrogênio foi reduzido na testemunha sem controle. Para os demais macronutrientes e para os micronutrientes não foi constatado efeito significativo devido à interferência das plantas daninhas.

Tersi (2001) ainda avaliou as três safras subseqüentes do mesmo experimento, constatando que os tratamentos sem mobilização do solo apresentaram produtividades iguais ou superiores aos demais tratamentos. Os resultados para a altura de plantas e teores foliares de macro e micronutrientes foram parecidos aos obtidos nos anos anteriores. A maioria dos índices tecnológicos (massa dos frutos, massa de suco por fruto, rendimento de suco, brix, ratio, quilogramas de sólidos solúveis por caixa, caixas por tonelada e frutos por caixa) não foi afetada nas safras avaliadas. A matéria orgânica, fósforo, potássio, cálcio e CTC do solo não foram afetados pelos tratamentos e existiram pequenas variações no pH, magnésio, soma de bases e saturação por bases. O tratamento com rotativa na linha reduziu o tamanho de agregados na superfície do solo e promoveu maior desestruturação superficial do solo, na projeção da copa, reduzindo a porosidade total do solo.

O efeito de dois sistemas de manejo de plantas daninhas sobre algumas características físicas do solo de cinco pomares cítricos da Bahia e Sergipe foi avaliado por Carvalho; Paes e Menegucci (2001). O sistema denominado como o do produtor constou de três capinas manuais nas linhas de plantio e três gradagens nas entrelinhas, enquanto que o sistema de manejo proposto como uma alternativa ao do produtor constou de duas aplicações de glyphosate nas linhas de plantio associado ao plantio de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes*) nas entrelinhas. Os resultados obtidos mostraram que o sistema proposto contribuiu para reduzir a densidade do solo e aumentar a porosidade total, resultante do aumento na macroporosidade. A velocidade inicial de infiltração da água no solo, a infiltração acumulada e o armazenamento de água foram maiores no sistema proposto. Ainda avaliando esses sistemas de manejo de plantas daninhas, Carvalho et al. (2002) determinaram que o sistema proposto apresentou melhores resultados para a produtividade da cultura.

Victoria Filho (1983), no Estado de São Paulo, realizando experimentos com uso contínuo de herbicidas por cinco anos em pomares de laranja 'Pêra' e 'Natal', enxertadas sobre limão 'Cravo', com dois e quatro anos de idade, respectivamente, constatou que nenhum dos tratamentos herbicidas testados afetou a qualidade e a produção de frutos: glyphosate, paraquat, bromacil+diuron, diuron, bromacil, terbacil, ametryn+sebumetone, simazine e atrazine.

Referências

BAKER, E. A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: CUTLER, D. F.; ALVIN, K. L.; PRICE, C. E. (Ed.). **The plant cuticle**. London : Academic Press, 1982. p.140-161.

BECERRIL, J. M.; DUKE, S. O.; LYDON, J. Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medic.). **Phytochemistry**, Oxford, v.28, p.695-699, 1989.

BERNER, D. K.; BERGGREN, G. T.; SNOW, J. P. Effects of glyphosate on *Calonectia crotalariae* and red crown rot of soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, p. 809-813, 1991.

BOUCHARD, D.C., ENFIELD, C. G.; PIWONI, M. D. Transport processes involving organic chemicals. In: SAWHNEY, B. L.; BROWN, B. L., (Ed.). **Reactions and movement of organic chemicals in soils**. Madison: Soil Science Society of America. 1989. p.349-372.

CAÑAL, M. J.; TAMÉS, R. S.; FERNÁNDEZ, B. Effects of glyphosate on phenolic metabolism in yellow nutsedge leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 69, p. 627-632, 1987.

CARVALHO, J.E.B.; PAES, J.M.V.; MENEGUCCI, J.L.P. Manejo de plantas daninhas em citros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.22, n.209, p.61-70, 2001.

CARVALHO, J.E.B.; SOUZA, L.S.; CALDAS, R.C.; ANTAS, P.E.U.T.; ARAÚJO, A.M.A.; LOPES, L.C.; SANTOS, R.C.; LOPES, N.C.; SOUZA, A.L.V. Leguminosa no controle integrado de plantas daninhas para aumentar a produtividade da laranja-‘Pêra’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.82-85, 2002.

CASELEY, J.C.; D. COUPLAND. Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake movement and acidity. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 92-123.

CATANEO, A.C.; DESTRO, G.F.G.; FERREIRA, L.C.; CHMMA, H.L.; SOUSA, D.C.F. Atividade da glutathione S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, Viçosa, v.21, n.2, p.307-312, 2003.

CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpet creeper with glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v.49, p.156-163, 2001.

CHEAH, U. B.; KIRKWOOD, R. C.; LUM, K. Y. Adsorption, desorption and mobility of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils. **Pesticide Science**, Chichester, v.50, p.53-63, 1997.

CHEAH, U. B.; KIRKWOOD, R. C.; LUM, K. Y. Degradation of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, p.1217-1223, 1998.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate – a literature analysis. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 48-74.

COLE, D. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. **Pesticide Science**, Chichester, v.42, p.209-222, 1994.

COLE, D.J.; DODGE, A.D.; CASELEY, J.C. Some biochemical effects of glyphosate on plant meristems. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.31, p.1665-1674, 1980.

COUPLAND, D. Metabolism of glyphosate in plants. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 25-34.

DEVINE, M. D.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: P T R Prentice Hall Englewood Cliffs, 1993. 441p.

DUKE, S. O.; HOAGLAND, R. E. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 92-123.

DURIGAN, J.C.; TIMOSSI, P.C. **Manejo de plantas daninhas em pomares cítricos**. Bebedouro: EECB, 2002. 52p. (Boletim Citrícola, 22)

EBERBACH, P. Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate [n-(phosphonomethyl)glycine] in four soils. **Pesticide Science**, Chichester, v.52, p.229-240, 1998.

EDWARDS, W.; TRIPLETT, G.; KRAMER, R. A watershed study of glyphosate transport in runoff. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.9, n.4, p.661-665, 1980.

ERICKSON, C. G. Management of glyphosate-related citrus fruit drop. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v.109, p.40-42, 1996.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate**: a unique global herbicide. Washington: ACS monograph, 1997. 653p.

GEIGER, D.R.; KAPITAN, S.W.; TUCCI, M.A. Glyphosate Inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.82, n.2, p.468-472, 1986.

GEIGER, D.R.; TUCCI, M.A.; SERVIATES, J.C. Glyphosate effects on carbon assimilation and gas exchange in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.85, n.2, p.365-369, 1987.

GELMINI, G.A.; NOVO, M.C.S.S.; NEGRI, J.D. de. **Manejo de plantas daninhas em citros**. Campinas: Fundação Cargill, 1998. 67p.

GERRITSE, R.G.; BELTRAN, J.; HERNANDEZ, F. Adsorption of atrazine, simazine and glyphosate in soils of the Gngangara Mound, Western Australia. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v.34, p.599-607, 1996.

GLASS, R. L. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.35, p.497-500, 1987.

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.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.40, p.347-369, 1989.

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.37, p.285-306, 1999.

HANCE, R. J. Adsorption of glyphosate by soils. **Pesticide Science**, Chichester, v.7, p.363-366, 1976.

HERRMANN, K. M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **Plant Cell**, Rockville, v.7, n.7, p.907-919, 1995.

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

HOAGLAND, R. E. Chemical interactions with bioherbicides to improve efficacy. **Weed Technology**, Champaign, v.10, p.651-674, 1996.

HOLLIDAY, M.J.; KEEN, N.T. The role of phytoalexins in the resistance of soybean leaves to bacteria: effect of glyphosate on glyceollin accumulation. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, p.1470-1474, 1982.

JOHAL, G.S.; RAHE, J.E. Role of phytoalexins in the suppression of resistance of *Phaseolus vulgaris* to *Colletotrichum lindemuthianum* by glyphosate. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v.12, n.3, p.225-235, 1990.

JONGE, H.; JONGE, L. W.; JACOBSEN, O. H. [¹⁴C] Glyphosate transport in undisturbed topsoil columns. **Pest Management Science**, London, v.56, p.909-915, 2000.

JONGE, H.; JONGE, L. W.; JACOBSEN, O. H.; YAMAGUSHI, T. MOLDRUP, P. Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. **Soil Science**, Baltimore, v.166, p.230-238, 2001.

KAWATE, M.K.; APPLEBY, A.P. Effect of soil pH on availability of glyphosate in soil to germination ryegrass seedlings. **Journal of Applied Seed Production**, Palmerston North, v.5, p.45-49, 1987.

KEEN, N.T.; HOLLIDAY, M.J.; YOSHIKAWA, M. Effects of glyphosate on glyciollin production and the expression of resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, p.1467-1470, 1982.

KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.111, p.349-153, 1996.

LEE, C.D.; PENNER, D.; HAMMERSCHMIDT, R. Influence of formulated glyphosate and activator adjuvants on *Sclerotinia sclerotiorum* in glyphosate-resistant and – susceptible *Glycine max*. **Weed Science**, Champaign, v.48, p.710-715, 2000.

LEE, C. D.; PENNER, D.; HAMMERSCHMIDT, R. Glyphosate and shape effects on glyphosate-resistant soybean defense response to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Weed Science**, Champaign, v.51, p. 294-298, 2003.

LIU, L.; PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. Effect of *Pythium* spp. and glyphosate on phytoalexin production and exudation by bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots grown in different media. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Baltimore, v.47, p.391-405, 1995.

LIU, L.; PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. Altered root exudation and suppression of induced lignification as mechanism of predisposition by glyphosate of bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.) to colonization by *Pythium* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.51, p.111-127, 1997.

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

McCONNEL, J. S.; HOSSNER, L. R. pH-dependent adsorption isotherms of glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.33, p.1075-1078, 1985.

MILES, C. J.; MOYE, H. A. Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.36, p.486-491, 1988.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; OSUNA, M.D.; PRADO, R.A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.3, p.445-451, 2004.

MOSHIER, L.J.; PENNER, D. Factors influencing microbial degradation of ^{14}C -glyphosate to $^{14}\text{CO}_2$ in soil. **Weed Science**, Champaign, v.26, p.686-691, 1978.

NICHOLIS, P. H.; EVANS, A. A. Sorption of ionisable organic compounds by field soils. Part 2: cations, bases and zwitterions. **Pesticide Science**, Chichester, v.33, p.331-345, 1991.

NOMURA, H.S.; HILTON, H.W. The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaii sugarcane soils. **Weed Research**, Oxford, v.17, p. 113-121, 1977.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. p.417-452.

PICCOLO, A.; CELANO, G.; CONTE, P. Adsorption of glyphosate by humic substances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, p.2442-2446, 1996.

PRATA, F. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina**. 2002. 149p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ROBERTSON, B.K.; ALEXANDER, M. Growth-linked and cometabolic biodegradation: possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide biodegradation. **Pesticide Science**, Chichester, v.41, p.311-318, 1994.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: IAPAR, 2005. 592p.

RODRIGUES, J.J.V.; WORSHAM, A.D.; CORBIN, F.T. Exudation of glyphosate from wheat (*Triticum aestivum*) plants and its effects on intraplanting corn (*Zea mays*) and soybeans (*Glycine max*). **Weed Science**, Chichester, v.30, p.316-320, 1982.

ROY, D. N.; KONAR, S. K.; BANERJEE, S.; CHARLES, D. A.; THOMPSON, D. G.; PRASAD, R. Persistence, movement and degradation of glyphosate in selected Canadian Boreal forest soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.37, p. 437-440, 1989.

RUEPPEL, M.L.; BRIGHTWELL, B. B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J. T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.25, p.517-528, 1977.

SALAZAR, L.C.; APPLEBY, A.P. Herbicidal activity of glyphosate in soil. **Weed Science**, Chichester, v.30, p.463-466, 1982.

SÃO JOSÉ, A.R. **Efeitos de métodos de controle de plantas daninhas na formação de pomar de laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck).** 1988. 117p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1988.

SERVIATES, J. C.; TUCCI, M. A.; GEIGER, D. R. Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.85, n.2, p.370-374, 1987.

SHARON, A.; AMSELLEM, Z.; GRESSEL, J. Glyphosate suppression of an elicited defense response. Increased susceptibility of *Cassia obtusifolia* to a mycoherbicide. **Plant Physiology**, Rockville, v.98, n.2, p.654-659, 1992.

SHIEH, W. J.; GEIGER, D. R.; SERVIATES, J. C. Effect of *N*-(Phosphonomethyl)glycine on Carbon Assimilation and Metabolism during a Simulated Natural Day. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, n.3, p.1109-1114, 1991.

SILVA, J.A.A.; DONADIO, L.C.; CARLOS, J.A.D. **Adubação verde em citros.** Jaboticabal: Funep, 1999. 37p. (Boletim Citrícola, 9)

SMITH, A. E.; AUBIN, A. J. Degradation of ¹⁴C-glyphosate in Saskatchewan soils. **Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology**. New York, v.50, p.499-505, 1993.

SOUZA, A.P.; PRATES, H.T.; FERREIRA, F.A.; REIS, E.L.; JORDÃO, C.P. Lixiviação do glyphosate e do imazapyr em solos com diferentes texturas e composição química. II. Método analítico. **Planta Daninha**, Botucatu, v.17, n.2, p.245-262, 1999a.

SOUZA, A.P.; FERREIRA, F.A.; SILVA, A.A.; CARDOSO, A.A.; RUIZ, H.A. Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr. **Planta Daninha**, Botucatu, v.17, n.3, p.387-398, 1999b.

SPRANKLE, P.; MEGGIT, W.; PENNER, D. Rapid inactivation of glyphosate in the soil. **Weed Science**, Chichester, v.23, p.224-228, 1975a.

SPRANKLE, P.; MEGGIT, W.; PENNER, D. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in soil. **Weed Science**, Chichester, v.23, p.229-234, 1975b.

STAHLMAN, P.W.; PHILLIPS, W.M. Effects of water quality and spray volume on glyphosate phytotoxicity. **Weed Science**, Chichester, v.27, n.1, p.38-41, 1979.

TERSI, F.E.A. **Avaliação de métodos de manejo do solo e de plantas daninhas em um pomar de laranja Valência**. 2001. 78p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2001.

TERSI, F.E.A.; SOUZA, E.C.A.; RIGOLIN, A.T. Efeito de métodos de manejo de plantas daninhas em crescimento, produtividade, qualidade do suco e estado nutricional de um pomar cítrico. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, n.1, p.119-133, 1999.

TORSTENSON, L. Behavior of glyphosate in soils and its degradation. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.137-150.

TOTH, J.; MORRISON, G. Glyphosate drift damages fruit trees. **Agricultural Gazette of New South Wales**, Sydney, v.88, p.44-45, 1977.

TOWNSON, J.K.; BUTLER, R. Uptake, translocation and phytotoxicity of imazapyr and glyphosate in *Imperata cylindrica*: effect of herbicide concentration, position of deposit and two methods of direct contact application. **Weed Research**, Oxford, v.30, p.235-243, 1990.

TUCKER, D.P.H. Glyphosate injury symptom expression in citrus. **HortScience**, Alexandria, v.12, n.5, p. 498-500, 1977.

UOTILA, M.; GULLNER, G.; KÖMIVES, T. Induction of glutathione S-transferase activity and glutathione level in plants exposed to glyphosate. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.93, p.689-694, 1995.

VICTORIA FILHO, R. **Efeitos do uso contínuo de herbicidas no desenvolvimento, produção e qualidade dos frutos de dois cultivares de citros (*Citrus sinensis* (L.) Orbeck)**. 1983. 232p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983.

VICTORIA FILHO, R. Manejo de plantas daninhas em citros no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS – TRATOS CULTURAIS, 5., 1998, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Fundação Cargill, 1998. p.357-376.

WANG, C. Y. Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, Champaign, v.15, p.628-635, 2001.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, Rockville, v.7, p.1001-1013, 1995.

WILCE, M.C.; PARKER, M.W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1205, p.1-18, 1994.

WYSS, G. S.; MÜLLER-SCHÄRER, H. Effects of selected herbicides on the germination and infection process of *Puccinia lagenophora*, a biocontrol pathogen of *Senecio vulgaris*. **Biological Control**, Orlando, v.20, p.160-166, 2001.

3 EFEITO DO GLYPHOSATE NAS CONCENTRAÇÕES DE CHIKUIMATO, AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS E FENÓIS E NA FOTOSSÍNTESE DE PLANTAS DE CITROS EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos do glyphosate nas concentrações de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenóis e na fotossíntese de plantas de citros, em condições controladas. Dois experimentos foram conduzidos com mudas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* L. Osbeck) de 4 meses de idade, aplicando-se as doses de 0, 180, 360 e 720 g e.a.ha⁻¹ de glyphosate aplicadas sobre a parte aérea das plantas. No primeiro experimento, avaliaram-se as respostas bioquímicas (chiquimato, aminoácidos livres totais, fenóis) das mudas aos 2, 4 e 8 dias após a aplicação (DAA), em folhas novas (20 dias) e maduras (1 a 3 meses). No segundo, avaliaram-se as características fotossintéticas (clorofila, fluorescência e trocas gasosas) entre 0 e 12 DAA, em folhas maduras (1 a 2 meses). Um terceiro experimento foi conduzido com mudas de 24 meses de idade de 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertada sobre 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus paradisi* Macf), comparando-se a aplicação ou não de 720 g e.a.ha⁻¹ de glyphosate sobre a parte aérea das plantas. As avaliações foram em épocas semelhantes às dos experimentos com limão 'Cravo', avaliando-se folhas novas (20 dias) e maduras (6 meses). O glyphosate afetou as concentrações de chiquimato e aminoácidos totais nas mudas de limão 'Cravo', porém os efeitos foram transitórios. Não houve efeito significativo nos conteúdos de fenóis e clorofila total e na atividade fotossintética. Não foi constatado qualquer efeito do glyphosate nas mudas de 'Valência' sobre 'Swingle', evidenciando significativa tolerância das plantas de citros ao herbicida.

Abstract

Effect of glyphosate on shikimate, total free amino acids and phenolic compounds and on photosynthesis in citrus under controlled conditions

The objective of this research was to evaluate the effects of glyphosate on shikimate, total free amino acids and phenolic compounds and on photosynthesis of citrus plants under controlled conditions. Two experiments were conducted using Rangpur lime (*Citrus limonia* L. Osbeck) rootstock with 4 months old, testing the dosages of 0, 180, 360 and 720 g a.e.ha⁻¹ of glyphosate applied on the plant canopies. By the first test, it was evaluated the plant biochemical responses (chiquimato, free amino acids totals, phenolic compounds) at 2, 4 and 8 days after the applications (DAA), in young (20 days) and mature leaves (1 to 3 months). By the second one, the photosynthetic characteristics were evaluated (chlorophyll, fluorescence and gas exchange) between 0 and 12 DAA, in mature leaves (1 to 2 months). Another experiment was conducted with 24 months old 'Valencia' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) scion on 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus paradisi* Macf) rootstock to compare the application or not of 720 g a.e.ha⁻¹ of glyphosate on the plant canopies. The evaluations were done at similar time of the experiments with Rangpur Lime rootstock, in young (20 days) and mature leaves (6 months). Glyphosate affected the contents of shikimate and total amino acids on Rangpur lime rootstock, however the effects were transitory. There was not significant effect on the phenolic compounds and total chlorophyll contents and on photosynthetic activities. It was not found any effect of glyphosate on 'Valencia' scions grafted on 'Swingle' rootstock, showing high tolerance of citrus plants to the herbicide.

3.1 Introdução

O herbicida glyphosate atua inibindo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, E.C. 2.5.1.19) e, consequentemente, afetando a via metabólica do chiquimato, que é responsável pela produção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, além de vários outros compostos secundários derivados destes aminoácidos. As conseqüências finais da ação do glyphosate incluem o retardamento no crescimento, clorose e necrose, principalmente nos drenos metabolicamente ativos, como folhas imaturas, brotos e raízes (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997).

Muitos trabalhos já foram realizados para avaliar a extensão dos danos causados pelo glyphosate nas plantas. Os efeitos são muito variados e incluem deficiência ou não de aminoácidos aromáticos (DUKE; HOAGLAND, 1981; HOLLÄNDER; AMRHEIN, 1980; JAWORSKI, 1972; WANG, 2001); toxidez devido ao acúmulo de chiquimato (WANG, 2001); aumento na produção de alguns fenóis e deficiência de outros (BECERRIL; DUKE; LYDON, 1989); desvio de energia devido à contínua síntese de chiquimato e redução da eritrose-4-fosfato que é utilizada na regeneração de ribulose bifosfato (SERVIATES; TUCCI; GEIGER, 1987; SHIEH; GEIGER; SERVIATES, 1991); aumento ou diminuição no conteúdo e redução no transporte de ácido idolilacético (AIA) (BAUR, 1979; CAÑAL; TAMÉS; FERNÁNDEZ, 1987; LEE, 1982); inibição da formação de clorofila e diminuição no conteúdo de clorofila (ABU-IRMAILEH; JORDAN, 1978; ALI; FLETCHER, 1978; KITCHEN; WITT; RIECK, 1981); e redução ou aumento na produção de etileno (ABU-IRMAILEH; JORDAN; KUMAMOTO, 1979; CAÑAL; TAMÉS; FERNÁNDEZ, 1987). Estes e outros efeitos, contraditórios ou não, podem ser encontrados em extensas revisões efetuadas por Cole (1985); Devine; Duke e Fedtke (1993); Duke e Hoagland (1985) e Franz; Mao e Sikorski (1997). Constata-se que vários fatores podem influenciar as respostas das plantas ao glyphosate, tais como a espécie (FUCHS et al., 2002), o biótipo (BAERSON et al., 2002), a dose de glyphosate e o tipo de tecido avaliado na planta (BECERRIL; DUKE; LYDON, 1989).

Relatos sobre as conseqüências bioquímicas e fisiológicas da aplicação de glyphosate atingido as plantas de citros, ou mesmo outras plantas perenes de grande porte, não foram encontrados na literatura. Provavelmente, essa ausência de estudos decorre da recomendação de se evitar o contato do herbicida com as partes verdes das plantas, prevenindo-se a intoxicação (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). No entanto, é relevante a realização de estudos com esta finalidade, pois eventualmente as folhas das plantas de citros são atingidas por ocasião de controle de plantas daninhas nos pomares, seja por pulverizações acidentais causadas por má regulação e uso dos equipamentos de pulverização; seja por contato da superfície das plantas daninhas com as folhas de citros, transferindo parte do produto nelas aplicado; ou seja por deriva causada pelo vento.

Neste contexto, O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos do glyphosate nas concentrações de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenóis e na fotossíntese de plantas de citros, em condições controladas.

3.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos em condições controladas, no laboratório de plantas daninhas do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Jaboticabal, SP.

3.2.1 Ensaios com mudas de limão ‘Cravo’

3.2.1.1 Instalação e condução

Dois experimentos foram conduzidos com plantas de limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* L. Osbeck) cultivadas nas mesmas condições. No primeiro foram avaliadas alterações bioquímicas nas plantas em função da aplicação do herbicida glyphosate e, no segundo, avaliou-se o comportamento fotossintético das plantas em função do herbicida.

As mudas de limão ‘Cravo’ foram obtidas em viveiro comercial, onde foram cultivadas em tubetes plásticos de 50 mL de capacidade, preenchidos com substrato comercial com vermiculita e composto orgânico. As mudas foram formadas a partir de sementes e apresentavam quatro meses de idade quando foram transferidas para a sala climatizada.

A sala climatizada foi mantida a 25°C(±2), com fotoperíodo de 14 horas, sob uma intensidade de luz fotossinteticamente ativa de 165 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na parte superior das plantas. As mudas com os tubetes foram acondicionadas em recipientes com 15 centímetros de comprimento e largura e 10 cm de profundidade (Figura 1). Os recipientes apresentavam uma tampa com abertura para acomodar o tubete, permitindo a sustentação das plantas na posição vertical. Os dois centímetros inferiores do tubete

foram submerso em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), que foi reposta semanalmente.

Figura 1 - Mudas de limão 'Cravo' crescendo em tubetes acondicionados em recipientes contendo solução nutritiva

3.2.1.2 Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos foram aplicados uma semana após a aclimação das plantas. As plantas foram submetidas às doses de 0, 180, 360 e 720 g e.a.ha⁻¹ de glyphosate. A aplicação foi efetuada sobre a parte aérea das plantas, com pulverizador pressurizado a CO₂, com pontas 110.02, mantido a 2,0 bar e calibrado para um consumo de calda de 200 L.ha⁻¹. Para a pulverização, as plantas com os tubetes foram retiradas da sala climatizada e transferidas para bandejas plásticas, sem a solução nutritiva. Nas aplicações do primeiro e do segundo experimento as temperaturas do ar foram iguais a 25 e 27°C e as umidades relativas do ar foram de 70 e 80%, respectivamente.

Cada muda constituiu uma unidade experimental e o delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições no primeiro experimento e cinco no segundo. No primeiro experimento, em função da necessidade de retirar as folhas para

as análises bioquímicas, destinou-se um grupo de plantas para cada época de avaliação. No segundo, as avaliações ao longo do tempo foram realizadas sempre nas mesmas plantas.

3.2.1.3 Avaliações

3.2.1.3.1 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram efetuadas aos 2, 4 e 8 dias após a aplicação dos tratamentos. Todas as folhas das plantas foram utilizadas para as análises bioquímicas, sendo elas divididas entre folhas novas (20 dias de idade) e folhas maduras (um a três meses de idade) (Figura 2). Antes da aplicação, o teor relativo de clorofila total das folhas novas era de 50,1 e das folhas maduras de 71,2. A determinação relativa da clorofila total foi feita por um clorofilômetro manual (Minolta, mod. SPAD 502).

Figura 2 - Folhas das plantas de limão 'Cravo' que foram utilizadas para as avaliações bioquímicas

As folhas coletadas em cada época de avaliação foram imediatamente congeladas em ultrafreezer (-80°C) e, posteriormente, armazenadas em freezer convencional, a -20°C, até serem liofilizadas. Após a liofilização, o material foi moído em micro moinho tipo Willey com peneira de 60 mesh e armazenado em dessecador até utilização para as análises.

Chiquimato

As concentrações de chiquimato foram determinadas conforme metodologia descrita por Singh e Shaner (1998). Para obtenção do extrato, uma amostra com 100 mg de folha liofilizada foi macerada em almofariz com 2 mL de tampão HCl 0,25 N. O extrato foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 30 minutos, e o sobrenadante foi recuperado para a determinação do chiquimato pelo método modificado de Gaitonde e Gordon (1958). Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi adicionada em 180 µL de água e, posteriormente, misturada a 500 µL de uma solução de ácido periódico 1% para oxidar o chiquimato. Após 3 horas, a amostra foi misturada com 500 µL de hidróxido de sódio 1 N, seguida de 300 µL de glicina 0,1 M e imediatamente feita a leitura da absorbância em 380 nm em espectrofotômetro. A concentração de chiquimato foi obtida a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de chiquimato.

Aminoácido livres totais, fenóis totais e escoparone

O extrato para análise de aminoácidos livres totais, fenóis totais e escoparone foi obtido colocando-se 200 mg de folha liofilizada em tubo de ensaio contendo 3 mL de etanol 80%. Os tubos contendo as amostras em álcool permaneceram por três dias em uma mesa agitadora, dentro de câmara fria (8°C). Após esse período o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 30 minutos, e o sobrenadante foi recuperado.

A determinação dos aminoácidos livres totais foi feita seguindo-se o método de reação colorimétrica dos aminoácidos com ninhidrina (YEMM; COOCKING, 1955). Para tanto, foram adicionados, em tubo de ensaio, 1000 µL do sobrenadante diluído 50 vezes; 500 µL de tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 5,0; 200 µL de ninhidrina 5%, em

metil celusolve; 1000 µL de solução de KCN 0,01 M diluída a 2% (v/v) em metil celusolve. Essa mistura foi levada ao banho térmico durante 20 min a 100°C. Os tubos de ensaios foram fechados para evitar a evaporação da solução. Após o resfriamento, foi adicionado etanol 60%, até completar 4 ml. A leitura foi em espectrofotômetro em 570 nm. A concentração de aminoácidos foi obtida a partir de uma curva padrão com leucina.

Os fenóis totais foram determinados pelo método espectrofotométrico de Swain e Hills (1959). Para tanto, 20 µL do sobrenadante foram diluídos em 3480 µL de água, adicionando-se 250 µL do reagente de Folin Ciocalteau. A mistura foi homogeneizada em agitador vortex e, após três minutos, foram adicionados 500 µL de Na₂CO₃ (17,5 g/50 mL), sendo efetuada nova agitação. Por fim, adicionou-se 750 µL de água e, após agitação, aguardou-se uma hora em bancada para posterior leitura da absorbância a 725 nm. Para os cálculos de concentração em relação à massa seca foi utilizada uma curva padrão com ácido clorogênico.

A separação dos fenóis foi feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC-Shimadzu) usando-se uma coluna Supelcosil LC18 (5 µm, 250 mm x 4 mm, Supelco), com um gradiente de 0 a 100% de metanol em solução aquosa a 0,5% de ácido acético, durante 20 minutos e com fluxo de 1 mL.min⁻¹. A detecção dos compostos eluindo da coluna foi feita com detector de UV operando a 280 nm e o sinal integrado em estação de trabalho com o software ClassVP (Shimadzu). A concentração do fenol escoparone (4,6-dimetoxicumarina) foi obtida por comparação com uma solução padrão de escoparone (Sigma).

3.2.1.3.2 Análises fotossintéticas

As análises fotossintéticas foram efetuadas entre 0 e 12 dias após a aplicação dos tratamentos, na primeira e terceira folhas maduras completamente expandidas (um a dois meses de idade), considerando-se a ápice das plantas.

Clorofila total

Os teores relativos de clorofila total foram determinados por um clorofilômetro manual (Minolta, mod. SPAD 502). O SPAD fornece leituras que se correlacionam com o teor de clorofila presente na folha. Os valores são calculados pela leitura diferencial da quantidade de luz transmitida pela folha, em duas regiões de comprimento de onda (650 nm e 940 nm). A absorção de luz pela clorofila ocorre no primeiro comprimento de onda (SWIADER; MOORE, 2002).

Fluorescência

As determinações relativas à emissão de fluorescência da clorofila *a* foram efetuadas com um fluorímetro portátil (HANSATEC, mod. Plant Efficiency Analyser - PEA) (Figura 3), conforme Alves (1998) e Oliveira (2000). A luz de excitação do aparelho utilizada nos ensaios foi padronizada em $2400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na superfície da folha, correspondente a 80% da intensidade máxima fornecida pelo aparelho. As folhas foram pré-adaptadas no escuro por 30 minutos antes das determinações de fluorescência. A adaptação no escuro correspondeu a uma área circular do limbo foliar de quatro milímetros de diâmetro. O parâmetro avaliado foi a razão F_V/F_M (fluorescência variável/fluorescência máxima), que apresenta uma variação típica entre 0,75 e 0,85 e é uma medida do potencial máximo da eficiência quântica fotoquímica do fotossistema II (PS_{II}) (BOLHÁR-NORDENKAMPF; ÖQUIST, 1993).

Medidas de trocas gasosas

As taxas de fotossíntese e de transpiração e a condutância estomática foram determinadas com um analisador portátil de CO_2 por radiação infravermelha (LI-COR, mod. LI-6400) (Figura 4), conforme Medina (2002). As medidas foram efetuadas em uma área foliar de 6 cm^2 . Durante as medidas, devido à variação na concentração de CO_2 do ar dentro da sala climatizada, optou-se por captar o ar externo à sala por meio de um tubo flexível adaptado ao aparelho. A concentração de CO_2 no ar captado pelo aparelho durante as avaliações variou entre 350 e $360 \mu\text{mol CO}_2.\text{mol}^{-1}$. O fluxo de ar para a câmara de fotossíntese foi mantido a $450 \mu\text{mol.s}^{-1}$ e a temperatura na câmara a

25°C. A densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) nas medidas tomadas para a primeira folha madura foi entre 160 e 165 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e, para a terceira folha, entre 140 e 145 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Figura 3 - Exemplo ilustrativo da medida de fluorescência com o fluorímetro portátil (HANSATEC, mod. Plant Efficiency Analyser - PEA)

Figura 4 – Analisador portátil de CO₂ (LI-COR, mod. LI-6400) utilizado para medidas de trocas gasosas em folhas de plantas de limão 'Cravo' submetidas a diferentes doses de glyphosate

3.2.1.4 Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância considerando-se os efeitos da dose do glyphosate e época de avaliação. No experimento para as variáveis bioquímicas a análise foi realizada seguindo o esquema fatorial (dose x época), pois se destinou um grupo de parcelas para cada época de avaliação. Já no experimento para as variáveis fotossintéticas a análise foi seguindo o esquema de parcelas subdivididas no tempo (dose x época), pois as avaliações foram efetuadas nas mesmas parcelas ao longo do tempo. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.2 Ensaio com mudas de 'Valência' sobre 'Swingle'

3.2.2.1 Instalação e condução

O experimento foi conduzido sob condições controladas, em vasos com 15 L de capacidade contendo substrato comercial com vermiculita e composto orgânico. As mudas de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas sobre citrumelo 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus paradisi* Macf) foram obtidas em viveiro comercial, quando possuíam 12 meses de idade. Após a aquisição, as mudas foram podadas para a formação dos ramos principais e transplantadas para os vasos, individualmente, para o cultivo em casa-de-vegetação até a aplicação dos tratamentos. Logo após a aplicação dos tratamentos as plantas foram transferidas para o ambiente externo, visando evitar-se a interferência da cobertura da casa-de-vegetação durante as avaliações de fotossíntese.

A manutenção das mudas foi feita com irrigações diárias e adubações foliares quinzenais com fosfito (0,1%, contendo 40% de P_2O_5 e 20% de K_2O) e formulação de micronutrientes (0,075%, contendo 10% de N, 6% de Zn, 3% de Mn, 0,3% de B e 0,1% de Mo). O controle de pragas foi efetuado com uma aplicação de imidacloprid via solo ($0,35 \text{ g.planta}^{-1}$), logo após o transplântio para os vasos; uma aplicação foliar com dimetoato (40 g.100 L^{-1}), abamectina ($0,27 \text{ g.100 L}^{-1}$), óleo mineral (0,25%) e

imidacloprid (3 g.100 L^{-1}), aos 9 meses após o transplântio; e uma aplicação de clorpirifós (96 g.100 L^{-1}), aos 11 meses após o transplântio. Os tratamentos foram aplicados quando as mudas possuíam 24 meses de idade.

3.2.2.2 Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos consistiram na aplicação ou não de $720 \text{ g e.a.ha}^{-1}$ de glyphosate sobre a parte aérea das plantas. Na aplicação foi utilizado um pulverizador costal pressurizado a CO_2 , com pontas 110.02, mantido a 2,0 bar e calibrado para um consumo de calda de 200 L.ha^{-1} . Durante a pulverização a temperatura do ar foi de 27°C e umidade relativa do ar foi de 70%. Cada planta constituiu uma unidade experimental e o delineamento foi inteiramente casualizado, com 3 repetições para as análises bioquímicas e 6 repetições para as análises fotossintéticas.

3.2.2.3 Avaliações

As mesmas análises bioquímicas realizadas nas folhas de limão 'Cravos' foram efetuadas em folhas de ramos novos das plantas de 'Valência', com aproximadamente 20 dias de idade, e folhas de ramos maduros, com seis meses de idade. Coletaram-se quatro folhas de cada idade, por planta, aos 2, 4 e 8 dias após a aplicação (DAA) do herbicida. As folhas estavam localizadas no terceiro ou quarto nó do ramo, a partir do ápice.

As medidas de clorofila, fluorescência e trocas gasosas foram tomadas em duas folhas marcadas de cada idade, por planta, entre 0 e 12 DAA. Os mesmos procedimentos utilizados para as plantas de limão 'Cravo' foram adotados para as medidas de clorofila. A única diferença nas medidas de fluorescência foi a luz de excitação do aparelho, que foi padronizada em $3000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na superfície da folha, correspondente a 100% da intensidade máxima fornecida pelo aparelho. As taxas de fotossíntese e de transpiração e a condutância estomática foram medidas entre 16:00 e 18:00 horas, desconsiderando-se o horário de verão. Durante as medidas, utilizou-se o ar ambiente, que apresentou concentração entre 350 e $360 \mu\text{mol CO}_2.\text{mol}^{-1}$. O fluxo de

ar para a câmara de fotossíntese foi mantido a $450 \mu\text{mol.s}^{-1}$ e a temperatura na câmara a 28°C , sendo esta próxima a temperatura ambiente no momento das avaliações. Não houve controle da luz e nas análises somente foram consideradas as medidas feitas com luminosidade superior a $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, conforme Medina (2002).

3.2.2.4 Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância no esquema de parcelas sub-subdivididas, considerando-se os efeitos da aplicação ou não do glyphosate, da idade da folha e época de avaliação (glyphosate x idade da folha x época). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Mudanças de limão ‘Cravo’

O metabolismo das plantas de limão ‘Cravo’ foi afetado pelo glyphosate nas doses testadas (Tabela 1), mesmo não tendo sido observados sintomas visuais de intoxicação até 8 dias após a aplicação (DAA), quando o estudo foi encerrado (Figura 5).

As concentrações de chiquimato nas folhas das plantas de limão cravo sem aplicação do glyphosate foram superiores às encontradas na literatura para outras plantas (Tabela 2). Os valores obtidos para as folhas novas e maduras das testemunhas estiveram entre $16,8$ e $23,6 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de massa seca, que equivalem a aproximadamente $5,9$ e $8,3 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de massa fresca, considerando-se um conteúdo de 65% de água nas folhas (valor este obtido após liofilização das amostras de folhas). Singh e Shaner (1998) e Pline et al. (2002), avaliando plantas de milho, soja e algodão não tratadas com glyphosate, observaram concentrações de chiquimato inferiores a $0,8 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de massa fresca.

Tabela 1 - Valores de F obtidos para os efeitos da dose de glyphosate e da época de avaliação nas concentrações de chiquimato, aminoácidos livres totais, fenóis totais e escoparone nas folhas novas e maduras de mudas de limão 'Cravo'

Fonte de variação	Chiquimato		Aminoácidos livres totais		Fenóis totais		Escoparone	
	Nova	Madura	Nova	Madura	Nova	Madura	Nova	Madura
Dose (D)	8,25**	4,36*	1,43 ^{ns}	3,16*	0,77 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,22 ^{ns}	7,56*
Época (E)	6,08**	4,07*	4,47*	5,87**	15,03**	7,71**	0,24 ^{ns}	3,53 ^{ns}
D x E	1,76 ^{ns}	0,73 ^{ns}	2,93*	2,96*	0,84 ^{ns}	1,20 ^{ns}	0,68 ^{ns}	5,98*
CV (%)	24,3	20,8	16,1	13,9	14,9	13,7	38,5	44,6

** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ns – não significativo a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação

Figura 5 – Mudas de limão 'Cravo' submetidas à pulverização de diferentes doses de glyphosate sobre a parte aérea, aos 8 dias após a aplicação (DAA)

Tabela 2 - Concentrações de chiquimato nas folhas novas e maduras de mudas de limão 'Cravo' em função da dose de glyphosate

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Chiquimato (μmol.g ⁻¹ massa seca)			
	2 DAA ¹	4 DAA	8 DAA	Média
Folhas Novas				
0	23,6	19,6	17,2	20,1 b
180	30,4	17,9	21,2	23,2 b
360	33,9	35,4	31,6	33,6 a
720	32,9	30,9	16,1	26,6 ab
Média	A 30,2	AB 25,9	B 21,5	-
Folhas Maduras				
0	19,6	16,8	17,1	17,8 b
180	20,5	19,6	19,1	19,7 ab
360	26,3	26,0	20,5	24,2 a
720	26,2	23,4	17,3	22,3 ab
Média	A 23,1	AB 21,4	B 18,5	-

¹ DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; valores com letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; valores dentro de cada época ou dose desacompanhados por letra não diferiram entre si.

Logo no segundo dia após a aplicação do herbicida houve acúmulo de chiquimato tanto nas folhas maduras quanto nas novas (Tabela 2). O acúmulo foi maior nas folhas mais novas, principalmente nas doses de 360 e 720 g e.a.ha⁻¹. As maiores concentrações de chiquimato nas plantas atingidas pelo glyphosate ocorreram aos 2 DAA. Posteriormente, houve tendência de redução nos valores observados, indicando efeito transitório do herbicida.

Muitos trabalhos mostram que o chiquimato acumula rapidamente nas plantas sensíveis logo após a aplicação de glyphosate. O acúmulo pode ocorrer nas folhas maduras (fonte de fotoassimilados), conforme constatado no presente trabalho, mas também é mais evidente nas regiões em crescimento das plantas (dreno de fotoassimilados) (BAERSON et al., 2002; BECERRIL; DUKE; LYDON, 1989; FUCHS et al. 2002; GEIGER; KAPITAN; TUCCI, 1986; LYDON; DUKE, 1988; PLINE et al., 2002). A maioria dos resultados mostra que o acúmulo de chiquimato está diretamente relacionado com o dano, tanto que Singh e Shaner (1998) propõem a quantificação do chiquimato como um método para identificação da injúria causada por este herbicida.

De maneira oposta, Pline et al. (2002) e Singh e Shaner (1998) mostraram que plantas transgênicas resistentes ao glyphosate não acumulam o chiquimato em quantidades significativa após a aplicação do herbicida. Baerson et al. (2002), pesquisando os mecanismos de resistência ao glyphosate de diferentes biotipos de azevém (*Lolium rigidum*), correlacionaram o menor acúmulo de chiquimato com a maior capacidade de resistência dos biotipos.

Doses letais de glyphosate causam aumentos na concentração de chiquimato superiores aos observados no presente trabalho. Geiger; Kapitan e Tucci (1986) observaram que o acúmulo de chiquimato em folhas maduras de *Beta vulgaris* (beterraba) inicia-se muito rapidamente, podendo atingir uma concentração 80 vezes superior à da testemunha, 24 horas após a aplicação. Fuchs et al. (2002), avaliando folhas maduras de *A. theophrasti*, não detectaram o acúmulo de chiquimato em plantas não tratadas, mas, após a aplicação do herbicida, observaram concentrações de até $0,17 \text{ mg.g}^{-1}$ de massa fresca. Singh e Shaner (1998), avaliando folhas novas de soja, constataram que a concentração de chiquimato aumentou de aproximadamente 0,4 para $40 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ de massa fresca, aos 8 DAA. No cartucho do milho, os mesmos autores observaram aumento de 0,4 para $12,8 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$, aos 8 DAA.

Becerril; Duke e Lydon (1989) estudaram o efeito de doses não letais de glyphosate em plantas de *Abutilon theophrasti*. O herbicida foi aplicado em folhas maduras e a avaliação efetuada em folhas novas. Aos 6 DAA, a concentração de chiquimato nas folhas novas das plantas tratadas foi bastante superior à da testemunha. Entretanto, aos 12 e 18 DAA, assim como no presente estudo, a planta mostrou recuperação, havendo significativa redução na concentração de chiquimato, atingindo valores próximos ao da testemunha.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos para as concentrações de aminoácidos livres totais nas plantas de limão 'Cravo'. Como consequência da ação do glyphosate, evidenciada pelo acúmulo de chiquimato, os teores de aminoácidos foram menores nas folhas das plantas tratadas, logo aos 2 DAA, independentemente da dose do herbicida. Provavelmente houve redução na produção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina devido a interrupção da rota metabólica do chiquimato (DUKE; HOAGLAND, 1981; HOLLÄNDER; AMRHEIN, 1980; JAWORSKI, 1972). Este

efeito negativo foi transitório e já aos 4 DAA as concentrações de aminoácidos totais nas plantas tratadas se igualaram à da testemunha. Inclusive, a concentração nas folhas maduras das plantas que receberam a maior dose do herbicida tendeu a ser superior às das demais plantas. Na avaliação posterior, aos 8 DAA, não houve qualquer diferença nas concentrações de aminoácidos das folhas entre todos os tratamentos, evidenciando recuperação do metabolismo normal das plantas.

Tabela 3 - Concentrações de aminoácidos livres totais nas folhas novas e maduras de mudas de limão 'Cravo' em função da dose de glyphosate

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Aminoácidos livres totais (mg.g ⁻¹ massa seca)										
	2 DAA ¹			4 DAA			8DAA			Média	
Folhas Novas											
0	A	10,2	a	A	8,0	a	A	9,9	a	9,8	a
180	B	6,8	b	AB	8,3	a	A	10,6	a	8,6	a
360	A	7,7	ab	A	9,5	a	A	8,8	a	8,6	a
720	A	6,7	b	A	9,1	a	A	8,6	a	8,1	a
Média	B	7,9		AB	8,8		A	9,4		-	
Folhas Maduras											
0	A	8,9	a	A	7,1	ab	A	8,6	a	8,2	a
180	B	6,9	ab	B	7,1	ab	A	9,6	a	7,9	a
360	A	6,1	b	A	6,9	b	A	8,0	a	7,0	a
720	A	7,4	ab	A	9,1	a	A	8,3	a	8,3	a
Média	B	7,3		B	7,6		A	8,6		-	

¹ DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; valores com letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não houve efeito do glyphosate nas concentrações de fenóis totais em qualquer parte avaliada na planta (Tabela 4). Este comportamento pode ser normal já que o efeito no acúmulo de chiquimato e nas concentrações de aminoácidos não foi intenso e foi transitório. Consequentemente, as concentrações de fenóis poderiam ser pouco alteradas.

É possível que o glyphosate altere qualitativamente a produção de fenóis, sem afetar o conteúdo de fenóis totais, por exemplo, aumentando a produção dos derivados direto do chiquimato e reduzindo a produção dos derivados de aminoácidos aromáticos, conforme demonstrado por Becerril; Duke e Lydon (1989). Por essa razão, neste estudo

avaliou-se também o efeito do glyphosate nas concentrações de escoparone (6,7 dimetoxicoumarina), que é um fenilpropanóide e é uma das mais importantes fitoalexinas induzidas na defesa das plantas de citros contra doenças, tais como *Phytophthora citrophthora* (AFEK; SZTEJNBERG, 1989), *Diaphorte citri* (ARIMOTO; HOMMA; OHSAWA, 1986) e *Penicillium digitatum* (KIM et al., 1991).

Tabela 4 - Concentrações de fenóis totais nas folhas novas e maduras de mudas de limão 'Cravo' em função da dose de glyphosate

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Fenóis totais (µg.g ⁻¹ massa seca)			
	2 DAA ¹	4 DAA	8DAA	Média
Folhas Novas				
0	14,0	13,4	15,9	14,5 a
180	10,9	14,4	16,7	14,0 a
360	12,1	15,1	17,8	15,0 a
720	11,2	13,6	16,0	13,6 a
Média	C 12,1	B 14,1	A 16,6	-
Folhas Maduras				
0	14,2	13,3	16,3	14,6 a
180	13,8	14,3	17,7	15,3 a
360	13,7	14,6	16,5	14,9 a
720	13,8	16,4	15,5	15,2 a
Média	B 13,9	B 14,6	A 16,5	-

¹ DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; valores com letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; valores dentro de cada época ou dose desacompanhados por letra não diferiram entre si.

As concentrações de escoparone foram maiores nas folhas novas de limão cravo, com valores próximos a 36 µg.g⁻¹ de massa seca na testemunha (Tabela 5). Nas folhas maduras, as concentrações de escoparone foram muito baixas, com valores próximos a 3 µg.g⁻¹ de massa seca na testemunha. As dosagens de escoparone mostraram que, a exemplo do que foi observado por outros autores, glyphosate não afetou quantitativamente os conteúdos de fenóis, mas afetou qualitativamente. Porém, ocorreu variação significativa apenas aos 8 DAA e em folhas maduras. Uma vez que o teor desta fitoalexina foi bem inferior em folhas maduras em comparação às folhas

jovens, é possível que esta variação esteja relacionada mais à idade das folhas amostradas do que ao efeito do herbicida.

Tabela 5 - Concentrações da fitoalexina escoparone nas folhas novas e maduras de mudas de limão 'Cravo' em função da aplicação ou não de glyphosate

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Escoparone (ug.g ⁻¹ massa seca)		
	2 DAA ¹	8 DAA	Média
Folhas Novas			
0	35,3	36,8	36,1 _a
720	34,1	40,7	37,4 _a
Média	A 34,7	A 38,8	-
Folhas Maduras			
0	A 2,8 _a	A 3,1 _b	2,9 _a
720	B 2,2 _a	A 7,6 _a	4,9 _a
Média	A 2,5	A 5,3	-

¹ DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; valores com letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; valores dentro de cada época ou dose desacompanhados por letra não diferiram entre si.

As análises de variâncias para os resultados obtidos para clorofila total, eficiência quântica do PS_{II} (razão F_V/F_M , determinada a partir da fluorescência da clorofila a), taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática e transpiração das plantas de limão 'Cravo' estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de F para os efeitos da dose de glyphosate e da época de avaliação no teor relativo de clorofila total, na eficiência quântica do fotossistema II (PS_{II}), taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática e taxa de transpiração de folhas maduras de mudas de limão 'Cravo'

Fonte de variação	Clorofila total	Eficiência quântica do PS _{II} (F_V/F_M)	Taxa de assimilação de CO ₂	Condutância estomática	Taxa de transpiração
Dose (D)	0,31 ^{ns}	1,63 ^{ns}	1,25 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,32 ^{ns}
Época (E)	159,06 ^{**}	1,81 ^{**}	33,05 ^{**}	14,19 ^{**}	26,07 ^{**}
D x E	0,76 ^{ns}	1,08 ^{ns}	1,60 ^{ns}	2,34 ^{**}	2,13 ^{**}
CV-D (%)	10,0	3,9	12,6	52,5	39,1
CV-E (%)	2,6	2,3	14,6	36,3	28,3

** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; ns – não significativo a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação.

Assim como observado no ensaio para avaliar os efeitos bioquímicos do glyphosate nas plantas de limão 'Cravo', as plantas avaliadas quanto à fotossíntese não apresentaram sintomas visuais de intoxicação até 12 DAA.

Nenhuma das características avaliadas relacionadas à fotossíntese foi muito afetada pelo glyphosate. Os teores de clorofila foram crescentes durante o período de avaliação e não foram influenciados pelo herbicida (Tabela 7). A razão F_V/F_M não se alterou durante todo o período e também não foi influenciada pelo glyphosate (Tabela 7). A taxa de assimilação de CO_2 acompanhou o teor de clorofila, tendendo a ser diariamente crescente, sem efeito significativo do herbicida (Tabela 8). Os resultados para condutância estomática e a taxa de transpiração foram mais variáveis ao longo do tempo, mas, de forma geral, foram maiores nas últimas avaliações, conforme a taxa de assimilação de CO_2 . Efeitos negativos do herbicida na condutância estomática e a taxa de transpiração foram observados somente aos 8 DAA. Entretanto, este efeito não foi suficiente para afetar significativamente a taxa de fotossíntese. Nas demais avaliações não houve influência do glyphosate na condutância estomática e taxa de transpiração.

Relatos na literatura indicam que o glyphosate pode afetar o balanço hídrico das plantas, provocando aumento no conteúdo de ácido abscísico nas folhas e fechamento dos estômatos (CAÑAL; TAMÉS; FERNÁNDEZ, 1990; FUCHS et al., 2002). Desta forma, é possível que o herbicida tenha causado dano às raízes das plantas de citros, afetando a condutância estomática e a transpiração aos 8 DAA. No entanto, este efeito não chegou a influenciar a taxa fotossintética (Tabela 8), por não ter sido suficiente para afetar a concentração interna de CO_2 nas folhas (dados não apresentados).

Vários trabalhos mostram que o glyphosate afeta a eficiência fotossintética das plantas. Estudos conduzidos com *Beta vulgaris* mostraram que a quantidade de chiquimato que é acumulada devido à ação do glyphosate pode representar um forte dreno de carbono no ciclo de Calvin, pelo desvio de eritrose-4-fosfato, reduzindo drasticamente a produção fotossintética (SERVIATES; TUCCI; GEIGER, 1987; SHIEH; GEIGER; SERVIATES, 1991). Segundo Fuchs et al. (2002), plantas de *Abutilon theophrasti* também apresentam drástica redução na taxa da assimilação de CO_2 após a aplicação do glyphosate. No entanto, neste caso, os autores não constataram grande acúmulo de chiquimato e atribuíram os efeitos à destruição do sistema radicular, que

causou a redução na capacidade de absorção de água e, conseqüentemente, o fechamento gradual dos estômatos. Nestes dois exemplos, os estudos tiveram o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos na morte das plantas e, portanto, o glyphosate foi aplicado em doses letais. No presente estudo, o glyphosate causou apenas pequeno e transitório acúmulo de chiquimato e não houve dano expressivo às plantas. Conseqüentemente, não houve efeito significativo na taxa de assimilação de CO₂.

Tabela 7 - Teor relativo de clorofila total e eficiência quântica do fotossistema II (PS_{II}) em folhas maduras de mudas de limão 'Cravo' em função da dose de glyphosate

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Época da avaliação						
	Prévia	1 DAA ¹	2 DAA	4 DAA	8 DAA	12 DAA	Média
Clorofila total relativa (µg.cm ⁻²)							
0	54,6	55,6	56,1	58,5	62,4	68,1	59,2 a
180	53,6	55,3	55,9	59,4	61,8	67,1	58,9 a
360	54,0	55,3	56,3	57,4	61,0	66,5	58,4 a
720	55,8	56,9	58,1	58,4	63,5	67,1	60,0 a
Média	E 54,5	DE 55,8	D 56,6	C 58,4	B 62,2	A 67,2	-
Eficiência quântica do PS _{II} (F _V /F _M)							
0	0,840	0,842	0,834	0,853	0,828	0,844	0,840 a
180	0,822	0,833	0,814	0,821	0,824	0,834	0,825 a
360	0,830	0,815	0,830	0,832	0,819	0,820	0,824 a
720	0,810	0,808	0,804	0,846	0,828	0,833	0,821 a
Média	A 0,826	A 0,824	A 0,821	A 0,838	A 0,825	A 0,833	-

¹ DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; valores com letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; valores dentro de cada época ou dose desacompanhados por letra não diferiram entre si.

Tabela 8 - Taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática e taxa de transpiração em folhas maduras de mudas de limão 'Cravo' em função da dose de glyphosate

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Época da Avaliação							
	Prévia	8 HAA ¹	1 DAA ²	2 DAA	4 DAA	8 DAA	12 DAA	Média
Taxa de assimilação de CO ₂ (μmol.m ⁻² .s ⁻¹)								
0	2,58	2,08	2,45	2,59	3,50	3,77	3,86	2,97 _a
180	2,77	2,14	2,23	2,40	3,47	3,48	3,30	2,83 _a
360	2,61	2,74	2,49	2,33	3,32	3,25	4,29	3,00 _a
720	2,53	2,06	2,69	2,86	3,20	3,20	4,14	2,96 _a
Média	C 2,62	C 2,25	C 2,47	C 2,54	B 3,37	B 3,43	A 3,90	-
Condutância estomática (mol.m ⁻² .s ⁻¹)								
0	C 0,060 _a	C 0,026 _a	C 0,043 _a	BC 0,078 _a	AB 0,120 _a	A 0,135 _a	ABC 0,082 _a	0,078 _a
180	BC 0,070 _a	C 0,031 _a	C 0,038 _a	BC 0,053 _a	A 0,128 _a	AB 0,100 _{ab}	BC 0,065 _a	0,069 _a
360	AB 0,078 _a	B 0,046 _a	AB 0,064 _a	B 0,044 _a	AB 0,078 _a	AB 0,066 _b	A 0,107 _a	0,069 _a
720	AB 0,061 _a	B 0,037 _a	AB 0,074 _a	AB 0,068 _a	A 0,095 _a	AB 0,079 _b	AB 0,087 _a	0,072 _a
Média	BCD 0,067	E 0,035	DE 0,054	CDE 0,061	A 0,105	AB 0,095	ABC 0,085	-
Taxa de transpiração (mmol.m ⁻² .s ⁻¹)								
0	BC 1,01 _a	C 0,51 _a	BC 0,73 _a	BC 1,14 _a	A 1,91 _a	A 2,11 _a	AB 1,40 _a	1,26 _a
180	BC 1,14 _a	C 0,57 _a	C 0,64 _a	C 0,84 _a	A 1,95 _a	AB 1,76 _{ab}	BC 1,19 _a	1,16 _a
360	B 1,11 _a	B 0,78 _a	B 0,99 _a	B 0,70 _a	AB 1,34 _a	AB 1,30 _b	A 1,84 _a	1,15 _a
720	AB 0,97 _a	B 0,61 _a	AB 1,01 _a	AB 1,05 _a	A 1,57 _a	A 1,49 _{ab}	A 1,53 _a	1,17 _a
Média	B 1,06	C 0,62	BC 0,84	BC 0,93	A 1,69	A 1,67	A 1,49	-

¹ HAA – Horas após a aplicação dos tratamentos; DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; valores com letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; valores dentro de cada época ou dose desacompanhados por letra não diferiram entre si.

3.3.2 Mudanças de 'Valência' sobre 'Swingle'

Os resultados da análise de variância para os compostos bioquímicos e parâmetros fotossintéticos avaliados no experimento com mudas de valência enxertada sobre 'Swingle' estão respectivamente apresentados nas Tabelas 9 e 10. Somente foram significativos os efeitos da idade da folha e época de avaliação. Este resultado é normal e reflete as variações no desenvolvimento vegetativo ao longo do tempo. Não houve qualquer efeito significativo devido à aplicação do glyphosate ou à interação entre os diferentes fatores avaliados.

Tabela 9 - Valores de F obtidos para os efeitos do glyphosate, idade da folha e época de avaliação nas concentrações foliares de chiquimato, aminoácidos livres totais, fenóis totais e escoparone em plantas de 'Valência' sobre 'Swingle'

Fonte de variação	Chiquimato	Aminoácidos livres totais	Fenóis totais	Escoparone
Glyphosate (G)	7,44 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,62 ^{ns}	0,36 ^{ns}
Idade da Folha (I)	2,20 ^{ns}	10,93*	0,02 ^{ns}	.. ¹
Época (E)	7,01**	0,10 ^{ns}	15,76**	0,13 ^{ns}
G x I	0,01 ^{ns}	3,44 ^{ns}	0,01 ^{ns}	..
G x E	1,68 ^{ns}	1,37 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,52 ^{ns}
I x E	0,81 ^{ns}	0,39 ^{ns}	1,82 ^{ns}	..
G x I x E	1,01 ^{ns}	1,34 ^{ns}	0,92 ^{ns}	..
CV - G (%)	14,5	14,2	16,8	42,0
CV - I (%)	33,2	15,2	19,8	..
CV - E (%)	22,2	13,2	14,8	36,6

** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade; ns – não significativo a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação; ¹ O escoparone somente foi avaliado nas folhas novas.

Tabela 10 - Valores de F obtidos para os efeitos do glyphosate, idade da folha e época de avaliação no teor relativo de clorofila total, na eficiência quântica do fotossistema II (PS_{II}), taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática e taxa de transpiração de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle'

Fonte de Variação	Clorofila total	Eficiência quântica do PS _{II} (F _V /F _M)	Taxa de assimilação de CO ₂	Condutância estomática	Taxa de transpiração
Glyphosate (G)	2,07 ^{ns}	0,75 ^{ns}	2,01 ^{ns}	1,21 ^{ns}	2,11 ^{ns}
Idade da Folha (I)	64,07 ^{**}	7,38 *	0,01 ^{ns}	2,07 ^{ns}	4,01 ^{ns}
Época (E)	1,17 ^{ns}	4,96 ^{**}	5,79 ^{**}	2,33 *	1,69 ^{ns}
G x I	1,79 ^{ns}	0,71 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,42 ^{ns}
G x E	1,35 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,95 ^{ns}
I x E	1,65 ^{ns}	0,31 ^{ns}	1,35 ^{ns}	1,15 ^{ns}	0,80 ^{ns}
G x I x E	0,84 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,19 ^{ns}
CV - G (%)	6,3	9,6	25,4	33,1	29,1
CV - I (%)	18,8	12,3	58,2	59,2	43,9
CV - E (%)	6,6	8,3	32,9	44,9	39,7

** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; ns – não significativo a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação.

As médias obtidas para as diferentes características avaliadas estão apresentadas nas Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11. De forma geral, mesmo a comparação entre médias pelos seus erros padrões mostram que não houve efeito significativo do glyphosate nas plantas de citros.

A diferença mais marcante na comparação das médias pelos erros padrões ocorreu para as concentrações de chiquimato nas folhas maduras aos 8 DAA. No entanto, diferentemente do esperado, a concentração de chiquimato foi menor no tratamento com glyphosate. De qualquer forma, em qualquer uma das épocas ou tipo de folhas avaliadas não houve aumento nas concentrações de chiquimato devido ao glyphosate (Figura 6), o que normalmente é esperado quando o herbicida está atuando (SINGH; SHANER, 1998). Considerando-se que há uma estreita relação entre o acúmulo deste composto e o dano por glyphosate, é plausível afirmar que o herbicida teve pouco efeito nas folhas pré-formadas da planta. A ausência de efeitos significativos nos demais compostos bioquímicos (Figuras 7, 8 e 9) e nos parâmetros fotossintéticos (Figuras 10 e 11) avaliados concorda com esta afirmativa. Como consequência,

nenhum efeito tóxico visual foi observado durante o período das avaliações, que foi até 12 DAA.

O menor efeito do glyphosate nas mudas de 'Valência' em relação às de limão 'Cravo' se deve primariamente ao porte da planta, que era bastante diferente entre elas. O glyphosate é facilmente translocado; portanto, a planta com maior porte tem maior capacidade de diluí-lo nos seus mais diversos drenos, reduzindo o efeito tóxico (CASELEY; COUPLAND, 1985). Assim mesmo, não deve ser descartada a possibilidade de influência das diferenças genéticas, sendo interessante a realização de estudos neste sentido. De qualquer forma, o metabolismo dos dois materiais avaliados mostrou-se bastante tolerante ao glyphosate em doses que normalmente controlam diversas plantas daninhas dos citros.

Figura 6 - Concentrações de chiquimato nas folhas novas e maduras de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle' em função da aplicação ou não de glyphosate na dose de 720 g e.a.ha⁻¹. Tratamentos acompanhados por letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, independentemente da época de avaliação ou idade da folha. As barras representam as médias com seus respectivos erros padrões

Figura 7 - Concentrações de aminoácidos livres totais nas folhas novas e maduras de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle' em função da aplicação ou não de glyphosate na dose de 720 g e.a.ha⁻¹. Tratamentos acompanhados por letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, independentemente da época de avaliação ou idade da folha. As barras representam as médias com seus respectivos erros padrões

Figura 8 - Concentrações de fenóis totais nas folhas novas e maduras de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle' em função da aplicação ou não de glyphosate na dose de 720 g e.a.ha⁻¹. Tratamentos acompanhados por letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, independentemente da época de avaliação ou idade da folha. As barras representam as médias com seus respectivos erros padrões

Figura 9 - Concentrações da fitoalexina escoparone nas folhas novas de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle' em função da aplicação ou não de glyphosate na dose de 720 g e.a.ha⁻¹. Tratamentos acompanhados por letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, independentemente da época de avaliação. As barras representam as médias com seus respectivos erros padrões

Figura 10 - Teor relativo de clorofila total e eficiência quântica do fotossistema II (PS_{II}) em folhas novas e maduras de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle' em função da aplicação ou não de glyphosate na dose de $720 \text{ g e.a.ha}^{-1}$. Tratamentos acompanhados por letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, independentemente da época de avaliação ou idade da folha. Os pontos representam as médias com seus respectivos erros padrões

Figura 11 - Taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática e taxa de transpiração em folhas novas e maduras de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle' em função da aplicação ou não de glyphosate na dose de 720 g e.a.ha⁻¹. Tratamentos acompanhados por letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, independentemente da época de avaliação ou idade da folha. Os pontos representam as médias com seus respectivos erros padrões

3.4 Conclusões

- O glyphosate afetou as concentrações de chiquimato e aminoácidos totais nas mudas de limão 'Cravo', mas os efeitos foram transitórios. Não houve efeito significativo nos conteúdos de fenóis e de clorofila total e na atividade fotossintética.

- Não foi constatado efeito do glyphosate nos conteúdos de chiquimato, aminoácidos totais, fenóis e clorofila total e na atividade fotossintética de mudas de 'Valência' sobre 'Swingle', evidenciando significativa tolerância das plantas ao herbicida.

Referências

ABU-IRMAILEH, B. E.; JORDAN, L. S. Some aspects of glyphosate action in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Science**, Champaign, v. 26, p.700-703, 1978.

ABU-IRMAILEH, B. E.; JORDAN, L. S.; KUMAMOTO, J. Enhancement of CO₂ and ethylene production and cellulose activity by glyphosate in *Phaseolus vulgaris*. **Weed Science**, Champaign, v. 27, n.1, p. 103-106, 1979.

AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus of *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, n.7, 736-739, 1989.

ALI, A.; FLETCHER, R. A. Phytotoxic action of glyphosate and amitrole on corn seedlings. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 56, p. 2196-2202, 1978.

ALVES, P.L.C.A. **Comportamento fotossintetico de duas espécies de eucalipto sob condições fotoinibitórias**: alterações fotoquímicas em resposta a alta irradiância e baixa temperatura. 1998. 176 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

ARIMOTO, Y.; HOMMA, Y.; OHSAWA, T. Studies on citrus melanose and citrus stem-end rot by *Diaporthe citri* (Faw.) Wolf. Part 5. Identification of phytoalexin in melanose spot. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Toshima-Ku, v.52, p.620-625, 1986.

BAERSON, S. R.; RODRIGUEZ, D. J.; BIEST, N. A.; TRAN, M.; YOU, J.; KREUGER, R. W.; DILL, G. M.; PRATLEY, J. E.; GRUYS, K. J. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Champaign, v.50, p.721-730, 2002.

BAUR, J. R. Effects of glyphosate on auxin transport in corn and cotton tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v.63, p.882-886, 1979.

BECERRIL, J. M.; DUKE, S. O.; LYDON, J. Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medic.). **Phytochemistry**, Oxford, v.28, p.695-699, 1989.

BOLHÁR-NORDENKAMPF, H. R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D. O., SCURLOCK, J. M. O., BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R., LEEGOOD, R. C. AND LONG, S. P. (Ed.). **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman and Hall, 1993. p.193-206.

CAÑAL, M. J.; TAMÉS, R. S.; FERNÁNDEZ, B. Glyphosate-increased levels of indole-3-acetic acid in yellow nutsedge leaves correlated with gentisic acid levels. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.71, p.384-688, 1987.

CAÑAL, M. J.; TAMÉS, R. S.; FERNÁNDEZ, B. Glyphosate action on abscisic acid levels, stomatal response and electrolyte leakage in yellow nutsedge leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.28, n.2, p.215-220, 1990.

CASELEY, J.C.; D. COUPLAND. Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake movement and acidity. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.92-123.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate – a literature analysis. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.48-74.

DEVINE, M. D.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: P T R Prentice Hall Englewood Cliffs, 1993. 441p.

DUKE, S. O.; HOAGLAND, R.E. Effect of glyphosate on the metabolism of phenolic compounds: VII. Root-fed amino acids and glyphosate toxicity in soybean (*Glycine max*) seedlings. **Weed Science**, Champaign, v.29, p.297-302, 1981.

DUKE, S. O.; HOAGLAND, R. E. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide Glyphosate**. London: Butterworth, 1985. p.92-123.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate**: a unique global herbicide. Washington: ACS monograph, 1997. 653p.

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

GAITONDE, M.; GORDON, M. A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.230, p.1043-1050, 1958.

GEIGER, D. R.; KAPITAN, S. W.; TUCCI, M. A. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.82, p.468-472, 1986.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. p.1-32. (California Agricultural Experiment Station Circular, 347).

HOLLÄNDER, H.; AMRHEIN, N. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate: inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p.823-839, 1980.

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.

KIM, J.J.; BEN YEHOASHUA, S.; SHAPIRO, B.; HENIS, Y.; CARMELI, S. Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, n.3, p.880-885, 1991.

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

LEE, T.T. Mode of action of glyphosate in relation to metabolism of indole-3-acetic acid. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.54, p.289-294, 1982.

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

MEDINA, C.L. **Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranja 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica.** 2002. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

OLIVEIRA, J.G. **Efeitos fisiológicos da fotoinibição da fotossíntese em plantas jovens de cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** 2000. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

PLINE, W. A.; WILCUT, J. W.; DUKE, S. O.; EDMISTEN, K. L.; WELLS, R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.506-512, 2002.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas.** 5. ed. Londrina: IAPAR, 2005. 592p.

SERVIATES, J. C.; TUCCI, M. A.; GEIGER, D. Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.85, p.370-374, 1987.

SHIEH, W. J.; GEIGER, D. R.; SERVIATES, J. C. Effect of N-(phosphonomethyl)glycine on carbon assimilation and metabolism during a simulated natural day. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.1109-1114, 1991.

SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v.12, p.527-530, 1998.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.10, p.63-68, 1959.

SWIADER, J.M.; MOORE, A. SPAD - chlorophyll response to nitrogen fertilization and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.25, p.089-1100, 2002.

WANG, C. Y. Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, Champaign, v.15, p.628-635, 2001.

YEMM, E.M.; COOKING, E.C. Estimation of amino acids by ninhydrin. **Analyst**, London, v.80, p.209-213, 1955.

4 TOXICIDADE DE GLYPHOSATE EM PLANTAS NOVAS DE CITROS, RESULTANTE DE APLICAÇÃO CAULINAR OU FOLIAR

Resumo

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a toxicidade do glyphosate em plantas novas de citros, quando aplicado atingindo o caule ou a parte aérea, em condições de campo. Dois experimentos foram conduzidos para dois materiais vegetais: 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) sobre 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus paradisi* Macf), com 20 meses de idade, e 'Valência' sobre 'Cravo' (*Citrus limonia* L. Osbeck), com 27 meses de idade. No primeiro experimento aplicou-se o glyphosate nas doses de 0, 90, 180, 260, 540, 1080 e 2160 g e.a.ha⁻¹ atingindo o caule até 5 cm acima da região de enxertia, onde este era predominantemente verde. No segundo, o glyphosate foi aplicado sobre a parte aérea das plantas nas doses de 0; 3,6x10⁻²; 3,6x10⁻¹; 3,6; 36; 360; e 720 g e.a.ha⁻¹. Não houve efeito tóxico quando o glyphosate foi aplicado atingindo o caule. As plantas somente foram afetadas pelo glyphosate atingindo a parte aérea nas dose de 360 e 720 g e.a.ha⁻¹. O principal sintoma da intoxicação consistiu na emissão de brotações deformadas após a aplicação, indicando efeito nas regiões meristemáticas. Os efeitos das doses de 360 e 720 g e.a.ha⁻¹ aplicadas sobre a parte aérea foram pequenos ou inexistentes nas folhas pré-formadas, não refletindo em alteração nos conteúdos de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenóis totais, aos oito dias após a aplicação. Todas as plantas atingidas pelo glyphosate se recuperaram entre seis e doze meses após a aplicação, não diferindo das testemunhas quanto ao diâmetro de caule, diâmetro de copa e altura.

Abstract

Toxicity of glyphosate applied on stem or canopy in young citrus plants

The present research was conducted to evaluate glyphosate damage in citrus plants under application towards the trunk or canopy, in field conditions. The

experiments were conducted with two plant materials: 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) scion grafted on 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus paradisi* Macf) rootstock, with 20 months old, and 'Valência' scion grafted on 'Rangpur lime' (*Citrus limonia* L. Osbeck), with 27 months old. By the first experiment, glyphosate was sprayed at the dosages of 0, 90, 180, 260, 540, 1080 and 2160 g a.e.ha⁻¹ directly to the trunk up to 5 cm above the grafting region, where the color was predominantly green. By the second one, the glyphosate was sprayed to the plant canopies at dosages of 0; 3,6x10⁻²; 3,6x10⁻¹; 3,6; 36; 360; and 720 g a.e.ha⁻¹. There was no visual damage by glyphosate applied directly to the trunk. The plants only were affected by glyphosate sprayed directly to the canopies at dosages of 360 and 720 g a.e.ha⁻¹. The main intoxication symptom was in the newly flushes after the spray, indicating effect on meristems regions. The effects of glyphosate were low or none in the mature leaves. No effect was observed in shikimate, total free amino acids and total phenolic compounds levels at eight days after the spray. All plants that were affected by glyphosate recovered from 6 to 12 months after treatments, do not differing from the controls in stem and canopy diameter, and plant height.

4.1 Introdução

O glyphosate [n-(fosfonometil)glicina] é um herbicida não seletivo, sendo recomendado para o controle de mais de 150 espécies de plantas daninhas, incluindo plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas de ciclo anual ou perene (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Consiste no herbicida mais utilizado na citricultura brasileira, sendo comum a realização de três ou mais aplicações durante o ano, direcionadas às linhas de plantio, sob as copas das plantas. As recomendações do produto incluem que a pulverização não atinja as folhas e as partes verdes das plantas cultivadas; caso contrário, é possível a ocorrência de intoxicação (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Não há restrição quanto à pulverização atingindo o caule lenhoso.

Potencialmente, existem quatro rotas principais para entrada do glyphosate nas plantas frutíferas perenes, incluindo os citros: através das folhas ou tecidos verdes; pelo tronco ou outro tecido lenhoso; pelas raízes, via solo; e por brotos emitidos diretamente

das raízes ou troncos. Atkinson (1985) apresenta uma extensa revisão na qual constam os efeitos do glyphosate em espécies frutíferas submetidas à aplicação de glyphosate por estas quatro diferentes vias. De forma geral, as aplicações direcionadas ao solo, ao tronco não danificado e aos brotos oriundos das raízes foram seguras para as plantas. As aplicações direcionadas aos brotos somente afetou a eles mesmos. Os brotos emitidos na base dos troncos não foram incluídos nesta revisão, mas é esperado o mesmo comportamento dos brotos emitidos pelas raízes (VALERA-GIL; GARCIA-TORRES, 1994).

Na cultura dos citros são poucos os trabalhos encontrados sobre o efeito do glyphosate e estes basicamente se limitam à descrição visual dos sintomas. Tucker (1977) observou que plantas novas podem exibir diferentes graus de intoxicação, variando em função do local de aplicação, da idade da planta, maturidade do tecido e dose do herbicida. Aplicações atingindo somente o solo não afetaram as plantas. Os efeitos da aplicação atingindo as folhagens foram mais prejudiciais nas plantas e tecidos jovens e, nas plantas maduras, se limitaram às regiões atingidas pela pulverização. Os sintomas incluíram a desfolha, morte de ramos e malformação de rebrotas. Regiões do tronco lesionadas foram afetadas pelo herbicida, havendo inibição da cicatrização (formação de calo). Os sintomas causados nas brotações emitidas após o herbicida podem persistir até dois anos, havendo posterior desenvolvimento normal das plantas (TOTH; MORRINSON, 1977)

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a toxicidade do glyphosate em plantas novas de citros, quando aplicado atingindo o caule ou a parte aérea, em condições de campo.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Instalação e condução

A pesquisa foi conduzida durante 2004 e 2005, no setor experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP. O solo da área possui

textura média e é classificado como Argissolo Vermelho Amarelo. Suas principais características químicas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características químicas do solo na área experimental antes da instalação da pesquisa

Prof. cm	pH CaCl ₂	M.O. g.dm ⁻³	P mg.dm ⁻³	S mg.dm ⁻³	K -----mmol _c .dm ⁻³ -----	Ca	Mg	Al	H+Al -----mmol _c .dm ⁻³ -----	SB	T	V
0-20	4,5	16	13	5	0,8	14	6	1	22	20,8	42,8	49
20-40	5,1	13	5	14	0,7	11	4	0	18	15,7	22,7	47

Análise realizada pelo Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ/USP.

Prof. = profundidade; M.O. = matéria orgânica; SB = soma de bases; T = capacidade de troca de cátions; V = saturação por bases.

As precipitações e temperatura médias mensais durante os anos 2004 e 2005 estão apresentadas na Figura 1. Os dados foram coletados no Posto Agrometereológico do Departamento Ciências Exatas da ESALQ/USP, localizado a 0,8 quilômetros de onde foi realizada a pesquisa.

Figura 1 - Dados mensais de precipitação acumulada (mm) e temperatura média (°C) obtidos em 2004 e 2005 no Posto Agrometereológico do Departamento Ciências Exatas da ESALQ/USP, Piracicaba-SP

O solo foi preparado para o plantio com uma aração e duas gradagens. Após a última gradagem, foram abertos sulcos para facilitar o plantio das mudas de citros no

espaçamento de 7 x 4 metros. No preparo de cada cova para o plantio, adicionou-se 500 g de calcário dolomítico, 150 g de superfosfato triplo, 20 g de sulfato de zinco e 5 g de ácido bórico (Sanches, 1991).

Os materiais vegetais testados foram plantas de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas sobre limão 'Cravo' (*Citrus limonia* L. Osbeck) e plantas de 'Valência' enxertadas sobre citrumelo 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus paradisi* Macf). As mudas foram obtidas em viveiro comercial. Por ocasião do plantio as plantas de 'Cravo' apresentavam 27 meses de idade e as de 'Swingle' 20 meses, ambas com copa formada, com 3 a 4 ramos principais. O plantio foi 04/02/04.

As seguintes adubações foram efetuadas após o plantio: cloreto de potássio (35 g.planta⁻¹) e nitrato de amônio (30 g.planta⁻¹) via solo – 02/04; Mastercitrus (10%N, 4% P₂O₅, 6% K₂O, 1% S, 1% Mg, 4% Zn, 2% Mn, 0,5% B e 0,05% Mo) (200 mL.100 L⁻¹) via foliar – 02/04, 01/05 e 05/05. O controle de pragas foi efetuado com: aldicarb (4,5 g.planta⁻¹) aplicado via solo e imidacloprid (0,5 g.planta⁻¹) via tronco, em 02/04 e 01/05; abamectina (0,36 g.100 L⁻¹), em 01/05. As linhas de plantio foram capinadas sempre que as plantas daninhas atingiram mais de 30 cm de altura e as entrelinhas foram roçadas quando estas plantas atingiam entre 50 a 70 cm de altura.

4.2.2 Tratamentos e delineamento experimental

Dois experimentos foram realizados para cada porta enxerto. No primeiro, as plantas de citros foram submetidas a doses crescentes de glyphosate atingindo o caule e, no segundo, as plantas receberam aplicação de glyphosate sobre a parte aérea da plantas. A aplicação foi efetuada em 07/03/04 com pulverizador costal pressurizado com CO₂, mantido a pressão constante de 1,0 bar, com pontas do tipo 110.015 e calibrado para um consumo de volume de calda de 100 L.ha⁻¹.

As doses na aplicação atingindo o caule foram: 0, 90, 180, 260, 540, 1080 e 2160 g e.a.ha⁻¹ de glyphosate. O jato de aplicação foi dirigido à região basal do caule, até 15 cm de altura, a partir do nível do solo, sendo aplicado dos dois lados das plantas. A aplicação foi até cerca de 5 cm acima da região de enxertia, região onde o caule se

apresentava predominantemente verde. As doses na aplicação sobre a parte aérea das plantas foram: 0; $3,6 \times 10^{-2}$; $3,6 \times 10^{-1}$; 3,6; 36; 360; e $720 \text{ g e.a.ha}^{-1}$ de glyphosate.

Durante a aplicação dos tratamentos a temperatura do ar variou entre 25 e 30°C e a temperatura do solo entre de 23 e 25°C. A umidade relativa do ar permaneceu entre 50 e 70%. Cada planta constituiu uma unidade experimental e o delineamento de cada experimento foi em blocos casualizados, com três e quatro repetições para as plantas enxertadas sobre 'Cravo' e 'Swingle', respectivamente.

4.2.3 Avaliações

4.2.3.1 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram efetuadas com folhas coletadas de ramos maduros, com cinco meses de idade, localizadas no terceiro ou quarto nó do ramo, a partir do ápice. Coletaram-se quatro folhas por planta, aos 8 e 15 dias após a aplicação (DAA). As folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer convencional, a -20°C, até serem liofilizadas. Após a liofilização, o material foi moído em micro moinho tipo Willey com peneira de 60 mesh e armazenado em dessecador até utilização para as análises.

Chiquimato

As concentrações de chiquimato foram determinadas conforme metodologia descrita por Singh e Shaner (1998). Para obtenção do extrato, uma amostra com 100 mg de folhas liofilizadas foi macerada em almofariz com 2 mL de tampão HCl 0,25 N. O extrato foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 30 minutos, e o sobrenadante foi recuperado para a determinação do chiquimato pelo método modificado de Gaitonde e Gordon (1958). Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi adicionada em 180 µL de água e, posteriormente, misturada a 500 µL de uma solução de ácido periódico 1% para oxidar o chiquimato. Após 3 horas, a amostra foi misturada com 500 µL de hidróxido de sódio 1 N, seguida de 300 µL de glicina 0,1 M e imediatamente feita a leitura da

absorbância em 380 nm em espectrofotômetro. A concentração de chiquimato foi obtida a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de chiquimato.

Aminoácido livres totais e fenóis totais

O extrato para análise de aminoácidos livres totais e fenóis totais foi obtido colocando-se 200 mg de folha liofilizada em tubo de ensaio contendo 3 mL de etanol 80%. Os tubos contendo as amostras em álcool permaneceram por três dias em uma mesa agitadora, dentro de câmara fria (8°C). Após esse período o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 30 minutos, e o sobrenadante foi recuperado.

A determinação dos aminoácidos livres totais foi feita seguindo-se o método de reação colorimétrica dos aminoácidos com ninhidrina (YEMM; COOCKING, 1955). Para tanto, foram adicionados, em tubo de ensaio, 1000 µL do sobrenadante diluído 50 vezes; 500 µL de tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 5,0; 200 µL de ninhidrina 5%, em metil celusolve; 1000 µL de solução de KCN 0,01 M diluída a 2% (v/v) em metil celusolve. Essa mistura foi levada ao banho térmico durante 20 minutos a 100°C. Os tubos de ensaios foram fechados para evitar a evaporação da solução. Após o resfriamento, foi adicionado etanol 60%, até completar 4 ml. A leitura foi em espectrofotômetro em 570 nm. A concentração de aminoácidos foi obtida a partir de uma curva padrão com leucina.

Os fenóis totais foram determinados pelo método espectrofotométrico de Swain e Hills (1959). Para tanto, 20 µL do sobrenadante foram diluídos em 3480 µL de água, adicionando-se 250 µL do reagente de Folin Ciocalteau. A mistura foi homogeneizada em agitador vortex e, após três minutos, foram adicionados 500 µL de Na₂CO₃ (17,5 g.50 mL⁻¹), sendo efetuada nova agitação. Por fim, foram adicionados 750 µL de água e, após agitação, aguardou-se uma hora em bancada para posterior leitura da absorbância a 725 nm. Para os cálculos de concentração em relação à massa seca foi utilizada uma curva padrão com ácido clorogênico.

4.2.3.2 Clorofila e fluorescência

As medidas de clorofila e fluorescência foram efetuadas aos 8, 15, 30 e 60 dias após a aplicação dos tratamentos, em folhas semelhantes às utilizadas nas análises bioquímicas e folhas com sintomas de danos por glyphosate.

Os teores relativos de clorofila total foram determinados por um clorofilômetro manual (Minolta, mod. SPAD 502). O SPAD fornece leituras que se correlacionam com o teor de clorofila presente na folha. Os valores são calculados pela leitura diferencial da quantidade de luz transmitida pela folha, em duas regiões de comprimento de onda (650 nm e 940 nm). A absorção de luz pela clorofila ocorre no primeiro comprimento de onda (SWIADER; MOORE, 2002).

As determinações relativas à emissão de fluorescência da clorofila *a* foram efetuadas com um fluorímetro portátil (HANSATEC, mod. Plant Efficiency Analyser - PEA), conforme Alves (1998) e Oliveira (2000). A luz de excitação do aparelho utilizada nos ensaios foi padronizada em $3000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na superfície da folha, correspondente a 100% da intensidade máxima fornecida pelo aparelho. As folhas foram pré-adaptadas no escuro por 30 minutos antes das determinações de fluorescência. A adaptação no escuro correspondeu a uma área circular do limbo foliar de quatro milímetros de diâmetro. O parâmetro avaliado foi a razão F_V/F_M (fluorescência variável/fluorescência máxima), que apresenta uma variação típica entre 0,75 e 0,85 e é uma medida do potencial máximo da eficiência quântica fotoquímica do fotossistema II (PS_{II}) (BOLHÁR-NORDENKAMPF; ÖQUIST, 1993).

4.2.3.3 Crescimento das plantas

Durante a condução dos experimentos, os sintomas visuais de intoxicação pelo herbicida foram avaliados periodicamente, atribuindo valores de 0 a 100% em função da intensidade dos sintomas, sendo 0% equivalente à ausência de dano e 100% à morte da parte aérea da planta. Antes da aplicação dos tratamentos e aos 6 e 12 meses após, tomaram-se medidas da altura, diâmetro de copa e diâmetro de caule das plantas. A altura foi medida a partir do nível do solo, até o topo da planta, o diâmetro de copa foi medido nos sentidos perpendicular e paralelo à linha de plantio e o diâmetro de caule

foi medido na distância de 5 cm acima da região de enxertia das plantas, também nos sentidos perpendicular e paralelo à linha de plantio.

4.2.4 Análise dos dados

Os resultados da avaliação dos sintomas de intoxicação foram submetidos à análise descritiva. Os demais dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3. Resultados e discussão

Sintomas visuais de intoxicação pelo glyphosate somente foram observados nos experimentos com aplicação sobre a parte aérea das plantas, nas doses de 360 e 720 g e.a.ha⁻¹. Os sintomas apresentados pelos dois materiais vegetais foram diferentes em função do desenvolvimento das plantas e podem ser divididos em fases, conforme descrito a seguir:

- 'Valência' sobre 'Swingle' (Figura 2)

Fase I – Logo depois da aplicação, até cerca de 90 dias após, algumas poucas folhas, maduras ou recém amadurecidas (folhas totalmente expandidas), apresentaram manchas cloróticas, com centro necrosado (Figura 3). Estas folhas posteriormente caíram. A queda foi mais acentuada no final da Fase I, que coincidiu com o início da estiagem (mês de junho) (Figura 1). As notas de dano visual neste período chegaram a atingir 10% para a maior dose aplicada sobre a parte aérea, considerando-se as folhas sintomáticas e a aparente redução no crescimento. Por ocasião da aplicação, não haviam brotações recém emitidas nas plantas.

Fase II – Entre 60 e 90 dias após a aplicação (DAA) começaram a aparecer as primeiras brotações nas plantas. As plantas atingidas pelo glyphosate emitiram tanto brotações normais quanto deformadas (folhas estreitas) (Figura 3). A emissão de brotações foi desuniforme ao longo do tempo, em todas as plantas, com ou sem herbicida. Alguns ramos com brotações deformadas também apresentaram queda de folhas e morte da região apical. Este último efeito aparentemente foi favorecido pela

deficiência hídrica (Figura 1). As notas de dano visual neste período chegaram a 25% para a maior dose aplicada sobre a parte aérea, considerando-se a desfolha, brotações deformadas e a aparente redução no crescimento.

Fase III – A terceira fase coincide com o início do período das chuvas (Figura 1) e a retomada do crescimento das plantas pela intensificação na emissão de brotações. Nesta fase constatou-se evidente recuperação das plantas danificadas pelo glyphosate. As novas brotações foram normais, sem qualquer dano (Figura 3). Assim mesmo, as brotações emitidas anteriormente e que se apresentavam deformadas permaneceram na planta, podendo se facilmente identificadas. As notas de dano chegaram a 12% para a maior dose devido à persistência das brotações deformadas nas plantas.

- ‘Valência’ sobre ‘Cravo’ (Figura 4)

Fase I – Após a aplicação do herbicida, principalmente depois dos 60 dias iniciais, as plantas que receberam as doses de 360 e 720 g e.a.ha⁻¹ de glyphosate, na parte aérea, apresentaram brotações deformadas, características de dano por glyphosate. A emissão de novas brotações nas plantas enxertadas sobre limão ‘Cravo’ foi mais uniforme ao longo do tempo e ocorreu antes do que nas plantas sobre ‘Swingle’. Não houve qualquer sintoma de clorose, necrose ou desfolha nas vegetações pré-existentes ou emitidas após a aplicação do glyphosate. Por ocasião da aplicação, não haviam brotações recém emitidas nas plantas. Principalmente por consequência das brotações deformadas, notou-se significativa redução visual no crescimento das plantas atingidas na parte aérea pelas doses de 360 e 720 g e.a.ha⁻¹ de glyphosate, resultando em notas de dano de até 35% para a maior dose aplicada.

Fase II – A segunda fase é parecida com a terceira observada para as plantas enxertadas sobre ‘Swingle’. Ou seja, no início do período das chuvas (Figura 1) houve a retomada do crescimento das plantas pela intensificação na emissão de brotações, resultando em evidente recuperação das plantas danificadas pelo glyphosate. As novas brotações foram normais, sem qualquer sintoma de dano. Assim mesmo, as brotações emitidas anteriormente e que se apresentavam deformadas permaneceram na planta, podendo se facilmente identificadas. As notas de dano foram próximas a 5% para a maior dose aplicada sobre a parte aérea devido à persistência das brotações deformadas nas plantas.

Figura 2 – Toxicidade do glyphosate em plantas de 'Valência' sobre 'Swingle', quando aplicado em diferentes doses sobre a parte aérea

Figura 3 - Efeitos do glyphosate em plantas de 'Valência' sobre 'Swingle'. (I) – Clorose e necrose localizadas em algumas folhas; (I) – Brotações novas deformadas; (III) Brotações normais oriundas de ramos com sintomas

Figura 4 - Toxicidade do glyphosate em plantas de 'Valência' sobre 'Cravo', quando aplicado em diferentes doses sobre a parte aérea

O fato do glyphosate ter afetado principalmente as brotações emitidas após sua aplicação permite duas hipóteses associadas ou não: (i) logo após a aplicação, o herbicida se transloca na planta, atingindo as regiões meristemáticas, incluindo gemas axilares, afetando a posterior morfogênese das brotações; (ii) quando as brotações estão sendo emitidas, o glyphosate não metabolizado pela planta transloca-se juntamente com os fotoassimilados, afetando as brotações durante a morfogênese. Nenhuma destas hipóteses pode ser descartada; no entanto, muitos fatores podem prejudicar a ocorrência da segunda. Mesmo sendo comum que o glyphosate não seja metabolizado pelas plantas (COUPLAND, 1985), diferentes processos podem estar envolvidos na redução de sua disponibilidade no intervalo entre a aplicação e a emissão das brotações deformadas. A sua disponibilidade pode ser afetada pela ligação à enzima alvo (EPSPs), conjugação às moléculas orgânicas (CATANEO et al., 2003), exsudação radicular (RODRIGUES; WORSHAM; CORBIN, 1982) e, inclusive, alguma metabolização pelas plantas ou por microorganismos presentes nas plantas (COUPLAND, 1985; MONQUERO et al., 2004).

Tucker (1977), testando doses de glyphosate entre 1,7 a 6,6 kg e.a.ha⁻¹, atingindo as folhagens de plantas de citros em diferentes idades, verificou danos similares, ou seja, clorose e queda de folhas pré-formadas (incluindo a morte de ramos) e má formação das brotações subseqüentes. O autor verificou também que o efeito limitou-se às regiões atingidas pela pulverização de glyphosate. Ramos adjacentes não foram afetados. A persistência dos sintomas por até dois anos após a aplicação foi observada por Toth e Morrison (1977).

As concentrações de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenóis totais somente foram avaliadas nas plantas enxertadas sobre 'Swingle'. Mesmo com os danos visuais, aos 8 e 15 DAA não se constataram qualquer efeito nas concentrações destes compostos (Tabela 2). Diversos trabalhos indicam que o acúmulo de chiquimato pode ser indicador de intoxicação pelo glyphosate (BAERSON et al., 2002; BECERRIL; DUKE; LYDON, 1989; PLINE et al., 2002; SINGH; SHANER, 1998). Dois fatores podem explicar o não aumento nas concentrações de chiquimato: (i) a grande maioria das folhas não apresentavam sintomas de intoxicação, sendo pouco afetadas pelo

herbicida; (ii) os efeitos nas doses testadas são transitórios e tendo ocorrido antes de 8 DAA, conforme observado no Capítulo 3 desta tese.

Tabela 2 - Concentrações de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenóis totais em folhas de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle' em função da dose de glyphosate

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Chiquimato (μmol.g ⁻¹ massa seca)		Aminoácido Livres Totais (mg.g ⁻¹ massa seca)		Fenóis Totais (mg.g ⁻¹ massa seca)	
	8 DAA ¹	15 DAA	8 DAA	15 DAA	8 DAA	15 DAA
Aplicação Atingindo o Caule						
0	43,4	34,5	13,3	12,9	29,7	27,6
90	36,6	29,4	12,3	12,4	27,5	25,7
180	39,2	29,3	13,3	11,6	25,4	23,8
360	31,5	27,0	12,6	12,6	22,6	24,3
720	35,0	31,9	12,6	12,3	26,4	26,0
1080	44,8	33,2	14,4	11,6	27,6	25,8
2160	32,9	30,3	11,7	13,6	25,1	25,4
F	2,51 ^{ns}	1,57 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,88 ^{ns}	1,53 ^{ns}	1,41 ^{ns}
CV (%)	17,1	13,2	15,8	12,3	13,9	8,1
Aplicação Sobre a Parte Aérea						
0	38,6	36,7	11,7	12,8	27,5	29,2
0,036	43,9	31,4	17,2	13,3	30,8	30,4
0,36	33,1	27,4	11,4	14,7	25,3	31,7
3,6	31,6	31,3	10,8	11,9	24,8	28,6
36	41,9	34,3	14,1	13,6	28,1	30,9
360	31,6	25,3	13,3	10,7	25,1	31,4
720	33,6	30,5	12,2	13,3	23,4	30,5
F	1,93 ^{ns}	0,74 ^{ns}	1,39 ^{ns}	1,24 ^{ns}	1,25 ^{ns}	0,27 ^{ns}
CV (%)	20,3	28,8	28,7	17,7	16,9	13,9

¹ DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; ns – não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação.

Nenhum efeito foi observado nos teores relativos de clorofila total e na fluorescência da clorofila *a* (F_V/F_M) das folhas maduras não sintomáticas em todos os experimentos (Tabelas 3, 4 e 5). Visando caracterizar as folhas sintomáticas, o teor de clorofila e a fluorescência também foram determinados nas regiões cloróticas (Tabelas 3 e 4). Evidentemente houve menor conteúdo de clorofila e menor eficiência fotossintética (F_V/F_M) nestas regiões. Embora os mecanismos não sejam totalmente conhecidos, o glyphosate pode afetar o conteúdo de clorofila nas folhas tanto pela

redução na formação quanto no conteúdo das clorofilas preexistentes (COLE, 1985; FUCHS, 2002). Significativas mudanças nas características de fluorescência induzidas pelo glyphosate, logo após a aplicação, são conhecidas (IRELAND; PERCIVAL; BAKER, 1986) e parecem estar relacionadas com as modificações no metabolismo fotossintético do ciclo do carbono causadas pelo glyphosate, pelo dreno de eritrose-4-fosfato na formação de chiquimato (GEIGER; KAPITAN; TUCCI, 1986; MADSEN et al., 1995; SHIEH; GEIGER; SERVIATES, 1991). No entanto, as diferenças observadas no presente trabalho estão diretamente relacionadas com a drástica redução no conteúdo de clorofilas.

Tabela 3 - Teor relativo de clorofila total em folhas de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle' em função da dose de glyphosate

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Clorofila Total (µg.cm ⁻²)					
	Folhas Normais ¹				Folhas Cloróticas ²	
	8 DAA	15 DAA	30 DAA	60 DAA	30 DAA	60 DAA
Aplicação Atingindo o Caule						
0	60,5	64,1	66,6	77,3	.. ³	..
90	59,0	62,1	65,5	77,0	..	..
180	64,1	65,7	69,5	79,4	..	..
360	65,6	64,3	70,2	81,4	..	..
720	64,4	63,3	67,0	82,5	..	..
1080	63,7	62,7	66,0	78,8	..	..
2160	60,9	64,7	69,4	81,0	..	..
F	1,14 ^{ns}	0,38 ^{ns}	1,45 ^{ns}	2,59 ^{ns}	..	..
CV (%)	7,33	6,33	4,68	3,30	..	..
Aplicação Sobre a Parte Aérea						
0	63,6	64,5	67,4	75,1	51,5 a	72,6 a
0,036	62,6	63,0	67,2	70,5	47,9 ab	71,7 a
0,36	61,2	63,0	68,0	71,1	48,5 ab	71,8 a
3,6	64,1	66,7	67,4	71,4	49,1 ab	73,7 a
36	62,5	64,3	67,5	74,7	48,3 ab	73,8 a
360	62,2	64,9	67,2	71,9	35,2 bc	61,0 a
720	63,6	64,0	68,2	68,8	31,1 c	38,0 b
F	0,21 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,05 ^{ns}	2,53 ^{ns}	6,23 ^{**}	10,49 ^{**}
CV (%)	7,06	5,08	5,32	3,94	14,30	12,29

¹ DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; ** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; ns – não significativo a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação. ² As medidas foram tomadas nas regiões cloróticas das lesões causadas pelo glyphosate, quando presentes. ³ Não haviam folhas com clorose.

Tabela 4 - Eficiência quântica do fotossistema II (PS_{II}) em folhas de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle' em função da dose de glyphosate

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Eficiência quântica do PS _{II} (F _V /F _M)					
	Folhas Normais ¹				Folhas Cloróticas ²	
	8 DAA	15 DAA	30 DAA	60 DAA	30 DAA	60 DAA
Aplicação Atingindo o Caule						
0	0,730	0,782	0,769	0,774	.. ³	..
90	0,725	0,784	0,776	0,758	..	..
180	0,753	0,809	0,792	0,744	..	..
360	0,737	0,798	0,767	0,761	..	..
720	0,718	0,805	0,782	0,789	..	..
1080	0,756	0,803	0,781	0,777	..	..
2160	0,751	0,808	0,781	0,767	..	..
F	1,59 ^{ns}	0,67 ^{ns}	0,39 ^{ns}	1,12 ^{ns}	-	-
CV (%)	3,25	3,37	3,52	3,64	..	..
Aplicação Sobre a Parte Aérea						
0	0,741	0,777	0,792	0,745	0,727 a	0,750 a
0,036	0,718	0,748	0,771	0,767	0,678 a	0,768 a
0,36	0,736	0,764	0,791	0,774	0,710 a	0,757 a
3,6	0,729	0,776	0,778	0,751	0,736 a	0,758 a
36	0,751	0,789	0,793	0,748	0,741 a	0,770 a
360	0,734	0,779	0,783	0,771	0,508 ab	0,651 a
720	0,722	0,775	0,776	0,739	0,342 b	0,344 b
F	2,55 ^{ns}	1,83 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,61 ^{ns}	6,89 ^{**}	7,82 ^{**}
CV (%)	1,92	2,46	2,65	4,72	18,26	16,30

¹ DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; ** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; ns – não significativo a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação. ² As medidas foram tomadas nas regiões cloróticas das lesões causadas pelo glyphosate, quando presentes. ³ Não haviam folhas com clorose.

Tabela 5 - Teor relativo de clorofila total e eficiência quântica do fotossistema II (PS_{II}) em folhas de plantas de 'Valência' sobre 'Cravo' em função da dose de glyphosate

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Clorofila Total (µg.cm ⁻²)			Eficiência quântica do PS _{II} (F _v /F _M)		
	8 DAA ¹	15 DAA	30 DAA	8 DAA	15 DAA	30 DAA
Aplicação Atingindo o Caule						
0	70,3	66,5	76,0	0,760	0,789	0,792
90	69,6	71,4	77,0	0,788	0,745	0,798
180	64,3	67,5	76,0	0,797	0,788	0,799
360	66,6	68,1	75,8	0,779	0,784	0,799
720	70,3	72,0	77,8	0,797	0,795	0,782
1080	74,3	69,7	76,9	0,805	0,805	0,809
2160	65,5	71,9	75,7	0,800	0,788	0,803
F	0,80 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,13 ^{ns}	2,21 ^{ns}	0,90 ^{ns}	0,85 ^{ns}
CV (%)	9,70	9,32	4,98	2,27	4,33	2,06
Aplicação Sobre a Parte Aérea						
0	65,6	68,8	76,0	0,783	0,804	0,761
0,036	65,6	65,8	76,1	0,776	0,809	0,792
0,36	70,2	70,5	71,4	0,781	0,800	0,801
3,6	70,9	71,0	74,5	0,790	0,801	0,802
36	69,9	69,6	75,5	0,799	0,780	0,799
360	68,1	71,2	69,5	0,806	0,803	0,805
720	67,9	71,0	75,8	0,796	0,822	0,797
F	0,44 ^{ns}	0,78 ^{ns}	1,32 ^{ns}	1,06 ^{ns}	0,39 ^{ns}	1,04 ^{ns}
CV (%)	8,27	5,42	5,33	2,33	4,35	3,22

¹ DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; ns – não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação.

O crescimento das plantas enxertadas sobre 'Swingle', medido pelo diâmetro de caule, diâmetro de copa e altura das plantas, não foi afetado pelo glyphosate aos seis e doze meses após a aplicação (Tabela 6). Antes da aplicação do glyphosate, as plantas testemunhas dos experimentos atingindo o caule e a parte aérea apresentavam, em média, 1,42 cm de diâmetro de caule, 61,4 cm de diâmetro de copa e 101,4 cm de altura. Aos seis meses, estas mesmas medidas foram de 1,77, 66,5 e 113,6 cm e, aos doze meses, de 2,76, 90,1 e 134,1 cm, respectivamente. Nos primeiros 6 meses o crescimento das plantas foi lento, sofrendo influência das baixas temperaturas e deficiência hídrica (outono e inverno) (Figura 1). Posteriormente, com o aumento das temperaturas e maior disponibilidade de água no solo (primavera e verão), ocorreram

novos fluxos vegetativos e intenso crescimento. A diferença no crescimento entre o primeiro de segundo semestre pode ser claramente constatada pelo diâmetro de caule. O incremento do diâmetro no primeiro semestre foi de 25% e no segundo de 56%. O lento crescimento apresentado no primeiro semestre fez com que os danos visuais não se refletissem nas medidas de crescimento. Qualquer redução no crescimento causado pelo glyphosate deve ter sido muito pequena e, portanto, não pôde ser estatisticamente detectada nas medidas efetuadas.

Tabela 6 - Diâmetro de tronco e de copa, altura e densidade foliar de plantas de 'Valência' sobre 'Swingle' determinada antes (prévia) e aos 6 e 12 meses após a aplicação de glyphosate em diferentes doses

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Prévia			6 meses			12 meses		
	Diâmetro (cm)		Altura (cm)	Diâmetro (cm)		Altura (cm)	Diâmetro (cm)		Altura (cm)
	Tronco	Copa		Tronco	Copa		Tronco	Copa	
Aplicação Atingindo o Caule									
0	1,43	61,8	104,5	1,83	67,1	116,0	2,84	91,6	144,3
90	1,36	41,4	92,3	1,66	58,5	109,8	2,51	77,4	125,3
180	1,41	58,0	99,8	1,98	70,6	112,5	3,14	99,1	144,3
360	1,31	45,5	105,3	1,83	61,1	119,0	3,01	80,9	144,3
720	1,44	58,6	107,3	1,81	73,1	116,8	2,90	95,9	149,8
1080	1,35	41,6	97,3	1,79	65,8	117,5	3,09	101,4	140,0
2160	1,39	48,6	97,5	1,68	66,3	114,5	2,98	87,8	157,5
F	0,61 ^{ns}	2,63 ^{ns}	0,60 ^{ns}	1,78 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,23 ^{ns}	1,72 ^{ns}	2,13 ^{ns}	1,31 ^{ns}
CV (%)	8,3	20,8	13,7	8,8	16,7	11,5	10,9	13,8	12,0
Aplicação Sobre a Parte Aérea									
0	1,41	61,0	98,3	1,71	65,9	111,3	2,68	88,5	124,0
0,036	1,44	51,8	97,5	1,78	61,8	122,5	2,81	78,5	140,8
0,36	1,40	50,4	102,3	1,65	61,3	113,5	2,56	89,1	126,5
3,6	1,40	59,3	106,8	1,78	69,4	119,3	2,79	98,4	137,0
36	1,40	55,6	99,8	1,59	61,6	113,5	2,48	79,5	129,3
360	1,38	48,1	105,3	1,71	61,1	128,0	2,50	83,6	136,5
720	1,39	51,0	104,3	1,58	57,3	118,0	2,35	79,3	130,3
F	0,15 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,81 ^{ns}	1,35 ^{ns}	0,82 ^{ns}	1,59 ^{ns}	1,37 ^{ns}	0,69 ^{ns}
CV (%)	7,2	18,1	11,7	10,8	10,7	10,4	10,5	14,5	11,2

** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; ns – não significativo a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação.

O crescimento inicial do diâmetro de caule das plantas enxertadas sobre 'Cravo' foi afetado pelo glyphosate nas doses de 360 e 720 g e.a.ha⁻¹ aplicadas sobre a parte aérea (Tabela 7). Estas doses não diferiram entre si e reduziram o crescimento no diâmetro de caule, em relação à testemunha, em 17,8%, em média. As demais características de crescimento avaliadas aos 6 meses não diferiram estatisticamente. O menor crescimento dos caules pode ser consequência da redução na taxa fotossintética das plantas devido às brotações deformadas. Estas brotações apresentam folhas estreitas, menores que as normais, o que deve resultar em menor área fotossinteticamente ativa para as plantas. Aos doze meses não houve diferença entre tratamentos para todas as características avaliadas, confirmando a tendência de recuperação das plantas com a emissão de novas brotações não danificadas. Antes da aplicação dos tratamentos, as plantas testemunha apresentavam em média (dois experimentos) 1,87 cm de diâmetro de caule, 70,2 cm de diâmetro de copa e 113,5 cm de altura. Aos seis meses, estas mesmas medidas foram iguais a 2,88, 88,8 e 136,8 cm e, aos doze meses, a 4,26, 122,3 e 178,8 cm, respectivamente. As plantas sobre 'Cravo' foram menos afetadas que as sobre 'Swingle' pelo período de seca e temperaturas baixas ocorridos no primeiro semestre após a aplicação do herbicida. O incremento do diâmetro de caule no primeiro semestre foi de 54% e no segundo de 48%.

Os dois materiais vegetais estudados apresentavam significativas diferenças no início do estudo (porta enxerto e idade) e, por isso mesmo, tiveram algumas respostas diferentes frente à aplicação de glyphosate em doses elevadas sobre a parte aérea (360 e 720 g e.a.ha⁻¹). No entanto, apesar das diferenças iniciais, os dois materiais foram bastante tolerantes ao herbicida, não sofrendo qualquer dano quando atingidos no caule e sendo pouco afetados quando atingidos na parte aérea por doses que controlam diversas plantas daninhas, mostrando grande capacidade de recuperação. Embora os resultados tenham sido favoráveis, especialmente para a aplicação atingindo o caule verde das plantas, é importante a realização de trabalhos com repetidas aplicações nestas mesmas condições para confirmar a tolerância em longo prazo.

Tabela 7 - Diâmetro de tronco e de copa, altura e densidade foliar de plantas de 'Valência' sobre 'Cravo' determinada antes (prévia) e aos 6 e 12 meses após a aplicação de glyphosate em diferentes doses

Dose de glyphosate (g e.a.ha ⁻¹)	Prévia			6 meses			12 meses			
	Diâmetro (cm)		Altura (cm)	Diâmetro (cm)		Altura (cm)	Diâmetro (cm)		Altura (cm)	
	Tronco	Copa		Tronco	Copa		Tronco	Copa		
Aplicação Atingindo o Caule										
0	1,77	61,3	109,0	2,62	82,7	126,7	3,97	125,7	174,3	
90	1,92	74,3	104,0	2,88	102,0	132,7	4,40	120,7	175,7	
180	1,68	62,0	97,3	2,48	81,5	135,3	4,02	120,3	170,7	
360	1,83	70,8	101,7	2,83	95,5	127,3	4,32	132,2	169,7	
720	1,85	62,8	107,7	2,87	85,8	145,7	4,20	124,3	181,3	
1080	1,97	64,3	104,7	2,83	104,3	135,0	4,17	124,5	172,0	
2160	1,95	72,3	105,3	2,92	111,8	131,7	4,55	135,5	176,7	
F	2,36 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,74 ^{ns}	1,60 ^{ns}	2,46 ^{ns}	0,59 ^{ns}	1,44 ^{ns}	1,07 ^{ns}	0,15 ^{ns}	
CV (%)	6,2	15,7	7,5	8,0	13,8	10,8	7,1	7,5	10,5	
Aplicação Sobre a Parte Aérea										
0	1,97	79,0	118,0	3,13	a	95,0	147,0	4,55	118,8	183,3
0,036	1,77	75,3	109,7	2,88	abc	93,7	133,3	4,28	116,5	182,0
0,36	1,92	69,8	106,7	2,98	ab	90,5	120,0	4,05	133,3	165,7
3,6	1,97	67,0	124,7	2,88	abc	110,3	160,3	4,53	130,3	178,0
36	1,73	64,7	103,0	2,67	abc	90,8	131,7	4,15	123,5	164,0
360	1,63	62,8	99,0	2,50	c	81,3	120,3	3,92	129,8	162,3
720	1,78	72,7	111,0	2,65	bc	73,0	140,0	3,98	105,2	182,0
F	1,57 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,80 ^{ns}	5,33 ^{**}	2,05 ^{ns}	1,81 ^{ns}	2,39 ^{ns}	2,07 ^{ns}	0,80 ^{ns}	
CV (%)	9,7	17,9	15,4	5,8	15,6	13,7	6,8	9,7	10,5	

** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; ns – não significativo a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação.

4.4 Conclusões

- Não houve efeito tóxico nas plantas novas de citros quando o glyphosate foi aplicado atingindo o caule verde;

- As plantas de citros somente foram afetadas pelo glyphosate aplicado atingindo a parte aérea nas dose de 360 e 720 g e.a.ha⁻¹;

- O principal sintoma da intoxicação pelo glyphosate consistiu na emissão de brotações deformadas após a aplicação do herbicida, indicando efeito nas regiões meristemáticas;

- Os efeitos das doses de 360 e 720 g e.a.ha⁻¹ aplicadas sobre a parte aérea das plantas foram pequenos ou inexistentes nas folhas pré-formadas, não refletindo em qualquer alteração nos conteúdos de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenóis totais aos oito dias após a aplicação;

- Todas as plantas atingidas pelo glyphosate se recuperaram entre seis e doze meses após a aplicação, não diferindo das testemunhas quanto ao diâmetro de caule, diâmetro de copa e altura.

Referências

ALVES, P.L.C.A. **Comportamento fotossintetico de duas espécies de eucalipto sob condições fotoinibitórias**: alterações fotoquímicas em resposta a alta irradiância e baixa temperatura. 1998. 176p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

ATKINSON, D. Glyphosate damage symptoms and the effects of drift. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.455-465.

BAERSON, S. R.; RODRIGUEZ, D. J.; BIEST, N. A.; TRAN, M.; YOU, J.; KREUGER, R. W.; DILL, G. M.; PRATLEY, J. E.; GRUYS, K. J. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Champaign, v.50, p.721-730, 2002.

BECERRIL, J. M.; DUKE, S. O.; LYDON, J. Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medic.). **Phytochemistry**, Oxford, v.28, p.695-699, 1989.

BOLHÁR-NORDENKAMPF, H. R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D. O., SCURLOCK, J. M. O., BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R., LEEGOOD, R. C. AND LONG, S. P. (Ed.). **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman and Hall, 1993. p.193-206.

CATANEO, A.C.; DESTRO, G.F.G.; FERREIRA, L.C.; CHMMA, H.L.; SOUSA, D.C.F. Atividade da glutatona S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, Viçosa, v.21, n.2, p.307-312, 2003.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate – a literature analysis. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.48-74.

COUPLAND, D. Metabolism of glyphosate in plants. In: GROSSBARD E.; ATKINSON, D.A. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.25-34.

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

GAITONDE, M.; GORDON, M. A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.230, p.1043-1050, 1958.

GEIGER, D. R.; KAPITAN, S. W.; TUCCI, M. A. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.82, p.468-472, 1986.

IRELAND, C.R.; PERCIVAL, M.P.; BAKER, N.R. Modification of the induction of photosynthesis in wheat by glyphosate, an inhibitor of amino acid metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.37, p.299-308, 1986.

MADSEN, K.H.; HEITHOLT, J.J.; DUKE, S.O.; SMEDA, R.J.; STREIBIG, J.C. Photosynthetic parameters in glyphosate-treated sugar-beet (*Beta vulgaris* L.). **Weed Research**, Oxford, v.32, p.81-88, 1995.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; OSUNA, M.D.; PRADO, R.A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.3, p.445-451, 2004.

OLIVEIRA, J.G. **Efeitos fisiológicos da fotoinibição da fotossíntese em plantas jovens de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2000. 165p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

PLINE, W. A.; WILCUT, J. W.; DUKE, S. O.; EDMISTEN, K. L.; WELLS, R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.506-512, 2002.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: IAPAR, 2005. 592p.

RODRIGUES, J.J.V.; WORSHAM, A.D.; CORBIN, F.T. Exudation of glyphosate from wheat (*Triticum aestivum*) plants and its effects on intrplanting corn (*Zea mays*) and soybeans (*Glycine max*). **Weed Science**, Champaign, v. 30, p. 316-320, 1982.

SANCHES, A.C. Preparo e instalação de um pomar de citros. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.S. (Ed.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. V.1, p. 333-418.

SHIEH, W. J.; GEIGER, D. R.; SERVIATES, J. C. Effect of N-(phosphonomethyl)glycine on carbon assimilation and metabolism during a simulated natural day. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p.1109-1114, 1991.

SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v.12, p.527-530, 1998.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 10, p.63-68, 1959.

SWIADER, J.M.; MOORE, A. SPAD - chlorophyll response to nitrogen fertilization and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.25, p.089-1100, 2002.

TOTH, J.; MORRISON, G. Glyphosate drift damages fruit trees. **Agricultural Gazette of New South Wales**, Sydney, v.88, p.44-45, 1977.

TUCKER, D.P.H. Glyphosate injury symptom expression in citrus. **HortScience**, Alexandria, v.12, n.5, p.498-500, 1977.

VALERA-GIL A.; GARCIA-TORRES L.. Absorption and Translocation of Carbon14-glyphosate Applied to Olive Tree Suckers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.119, n.5, p.1020-1023, 1994.

YEMM, E.M.; COOKING, E.C. Estimation of amino acids by ninhydrin. **Analyst**, London, v.80, p.209-213, 1955.

5 QUEDA DE FRUTOS DE LARANJA 'PERA' ATINGIDOS PELO HERBICIDA GLYPHOSATE

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos do glyphosate na queda dos frutos de laranja 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e a relação entre a queda e a produção de etileno. Três experimentos foram conduzidos. No primeiro foi avaliado o efeito do glyphosate na queda de frutos em função da aplicação direcionada ao terço basal das plantas, atingindo diretamente folhas e frutos, em doses de 0, 180, 360 e 720 g e.a.ha⁻¹. No segundo avaliou-se a queda em função das doses de glyphosate de 0, 45, 90, 180, 360 ou 540 g e.a.ha⁻¹ direcionadas aos frutos (i), folhas (ii) ou frutos + folhas (iii). No terceiro determinou-se a relação entre a produção de etileno e a queda de frutos em função da aplicação da dose de 720 g e.a.ha⁻¹ sobre os frutos. O glyphosate aplicado direcionado à parte basal da planta, atingindo diretamente as folhas e frutos, promoveu significativa queda de frutos em fase final de desenvolvimento. Os frutos que caíram geralmente apresentavam sintomas característicos de amarelecimento e necrose, principalmente na região exposta à pulverização do herbicida. A qualidade tecnológica dos frutos que permaneceram na planta e estavam na região atingida pelo herbicida não foi afetada. A queda dos frutos ocorreu principalmente devido ao contato direto com a pulverização do glyphosate e não devido à translocação. O glyphosate promoveu a produção de etileno em frutos em fase final de maturação, causando a abscisão.

Abstract

Citrus fruit dropping caused by the herbicide glyphosate

The present study aimed to investigate the effect of glyphosate on citrus (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit dropping and the relationship between fruit dropping and ethylene production. Three experiments were conducted to this study. By the first one, it was evaluated the fruit dropping after glyphosate application directly to the plants at

dosages of 0, 180, 360 and 720 g a.e.ha⁻¹. By the second test, it was evaluated the fruit dropping at dosages of 0, 45, 90, 180, 360 or 540 g a.e.ha⁻¹ sprayed directly to the fruits (i), leaves (ii) or fruits + leaves. By the third test, it was determined the relationship between ethylene production and fruit dropping by glyphosate spraying (720 g a.e.ha⁻¹). Glyphosate applied directly to leaves and fruits caused fruit dropping in final phase of ripening. The fruits that drop to the ground generally presented symptoms characterized by yellow color and necrosis, mainly at the area exposed to the glyphosate spraying. The technological quality of those fruits that remained on the plant and were at the area reached by the herbicide was not affected. Fruit dropping occurred mainly due to the direct contact of the spraying instead of the herbicide translocation. Finally, glyphosate induced ethylene production in fruits already in final phase of ripening, causing its abscission.

5.1 Introdução

A abscisão é o desprendimento de frutos, flores, folhas e extremidade do caule controlado por hormônios, principalmente o etileno e as auxinas, pela atividade de enzimas de degradação e por vários outros agentes bióticos e abióticos (GOREN; TEITELBAUM; RATNER, 1973; YOUNG, 1972; REID, 1995; TAIZ; ZAIGER, 1998)

Nos frutos cítricos existem duas zonas de abscisão, uma na união do ramo ao pedúnculo e outras na região do cálice, formadas por camadas de células parenquimatosas de paredes finas e praticamente sem lignina e suberina. No primeiro mês após a antese, a abscisão ocorre principalmente na região entre o pedúnculo e o ramo, mas, com o crescimento dos frutos, há aumento progressivo da abscisão na região do cálice (GREENBERG; GOREN; RIOV, 1975). Durante o crescimento dos frutos, a abscisão é um processo freqüente, mas que diminui após a etapa denominada “queda fisiológica”. A queda acentuada de frutos nesta etapa é comum e ocorre devido à competição entre as folhas e os frutos jovens por assimilados. Posteriormente, até o amadurecimento, antes do início da senescência, a abscisão é menos freqüente e ocorre em função de estresses bióticos e abióticos, tais como danos mecânicos, pragas e doenças (LIMA; DAVIES; KREZDORN, 1980).

Tucker (1977) e Erickson (1996) relatam a queda de frutos devido à aplicação de glyphosate, principalmente em estádios mais avançados de amadurecimento. Erickson (1996) sugeriu que o glyphosate atua aumentando a produção de etileno, causando a abscisão dos frutos. Em plantas de feijão existem evidências de aumento na produção de etileno devido ao glyphosate (ABU-IRMAILEH; JORDAN; KUMAMOTO, 1979).

De fato, existe uma grande preocupação dos produtores com os danos de glyphosate nos frutos cítricos, havendo carência de estudos em condições brasileiras. A caracterização correta dos danos causados pelo glyphosate nos frutos permite identificar quando existe o problema e, conseqüentemente, orientar na tomada de medidas corretivas.

O presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos do glyphosate na queda dos frutos de laranja 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e a relação entre a queda e a produção de etileno.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Instalação e condução

Três experimentos foram conduzidos em Jaboticabal, SP, durante o ano de 2005. O pomar avaliado apresentava sete anos de idade, tendo sido formado por plantas de laranja 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas sobre limão 'Cravo' (*Citrus limonia* L. Osbeck). Durante a condução dos experimentos não foi realizada qualquer prática cultural na área.

5.2.2 Experimento I - Queda de frutos em função da aplicação de glyphosate dirigida ao terço basal das plantas

O estudo foi instalado em maio de 2005. Os tratamentos constaram da aplicação de glyphosate dirigida ao terço basal das plantas de citros nas doses de 0, 180, 360 e 720 g e.a.ha⁻¹. A aplicação foi com pulverizador pressurizado a CO₂, com duas pontas 110.02 espaçadas em 50 cm, mantido a 2,0 bar e calibrado para um consumo de calda

de 200 L.ha⁻¹. A pulverização foi na extensão de toda a circunferência das plantas, direcionada ao terço basal, com as pontas de pulverização distanciadas a 50 cm das folhagens e frutos. Dessa forma, a pulverização cobriu uma faixa de 1 metro de largura ao redor de toda a saia da planta. Durante a aplicação, a temperatura ambiente foi de 27°C e umidade relativa do ar de 55%. Cada planta constituiu uma unidade experimental e o delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições.

Antes da aplicação, 30 frutos com altura média de 6,98 cm e diâmetro de 6,55 cm, em estágio final de maturação, foram demarcados na região que posteriormente recebeu a aplicação dos tratamentos (Figura 1). Visando caracterizar os frutos quanto à maturação, procedeu-se a análise tecnológica de vinte frutos semelhantes aos demarcados, coletados em cinco plantas representativas do experimento. Os seguintes resultados foram obtidos: rendimento de suco – 52%; acidez titulável – 1,13 g ácido cítrico.100 ml⁻¹; sólidos solúveis totais – 8,3 °Brix; e Ratio – 7,38. As metodologias adotadas nestas determinações foram as mesmas utilizadas para avaliar a qualidade dos frutos por ocasião da colheita, conforme será descrito a seguir.

A queda dos frutos demarcados foi avaliada a cada dois dias, até a época da colheita, determinando-se a porcentagem de frutos caídos. Por ocasião da constatação do fruto caído, avaliou-se visualmente a presença de danos e a coloração predominante da casca na área não danificada.

A coloração predominante foi determinada por meio de escala visual de cor correlacionada com leituras fornecidas pelo colorímetro eletrônico Minolta CR-200 (INIA, 200-). O colorímetro eletrônico fornece leituras que permite o cálculo do índice de cor (IC). O índice de cor varia entre -20 e +20 para os diferentes estados comuns de coloração dos citros. Valores inferiores a -7 expressam coloração verde. Valores compreendidos entre -7 e +7 expressam tonalidades o verde amarelado (entre -7 e 0); amarelo pálido a laranja esverdeado (para valores próximos a zero) e laranja pálido (entre 0 e +7). Os valores superiores a +7 expressam colorações de tom laranja (JIMENEZ-CUESTA et al., 1983).

Figura 1 - Frutos demarcados para avaliação da queda em função a aplicação de glyphosate

Na colheita, realizada em agosto de 2005, determinou-se a coloração da casca, a altura e o diâmetro dos frutos demarcados e a qualidade dos frutos não demarcados, mas que estavam no terço da planta atingido pelo herbicida. As análises qualitativas foram efetuadas em 20 frutos por planta, determinando-se:

- a) Massa – determinado em balança de 10 quilogramas de capacidade, calculando-se a massa média por fruto;
- b) Rendimento em suco – calculado pela porcentagem de massa de suco da amostra, extraído em espremedor manual, em relação à massa dos frutos;
- c) Sólidos solúveis totais – determinado por refratometria, a 20 °C, e expressos em °Brix ($\text{g} \cdot 100\text{ml}^{-1}$), segundo método descrito por AOAC (1997);
- d) Acidez titulável – determinada por titulometria com solução de hidróxido de sódio, 0,1 M, tendo-se fenolftaleína como indicador (AOAC, 1997);
- e) Índice de maturação ou “ratio” – obtido por cálculo, dividindo-se o teor de sólidos solúveis totais (SST) pela acidez titulável.

5.2.3 Experimento II - Queda de frutos em função da aplicação de glyphosate dirigida aos frutos e/ou folhas

O experimento foi instalado em maio de 2005, no esquema de parcelas subdivididas e delineamento de blocos casualizados, com cinco repetições. As parcelas foram constituídas por plantas individuais de citros, que foram destinadas à aplicação de diferentes doses de glyphosate: 0, 45, 90, 180, 360 ou 540 g e.a.ha⁻¹. Em cada planta selecionaram-se três ramos (subparcelas), que receberam a aplicação do glyphosate somente nas folhas (i), nos frutos (ii) ou folhas + frutos (iii). Os ramos apresentavam 50 cm de comprimento e possuíam três frutos em estágio final de maturação. Os frutos selecionados foram semelhantes aos do Experimento I.

A aplicação foi feita com pulverizador manual calibrado para propiciar uma cobertura de área equivalente ao consumo de calda de 100 L.ha⁻¹. Durante a aplicação, as partes do ramo que não deveriam ser atingidas foram protegidas (folhas ou frutos). A temperatura ambiente por ocasião da aplicação foi de 28°C e umidade relativa do ar foi de 60%.

A queda dos frutos foi avaliada na colheita, determinando-se a porcentagem de frutos caídos.

5.2.4 Experimento III - Produção de etileno em frutos devido à aplicação de glyphosate

O ensaio foi instalado em novembro de 2005, com os tratamentos distribuídos no esquema fatorial 2 x 2 x 2. Os fatores em estudo foram a condição em que os frutos mantidos após a aplicação (campo ou laboratório), a aplicação de glyphosate sobre o fruto (0 ou 720 g e.a.ha⁻¹) e a idade do fruto (verdes ou em fase final de maturação). Cada fruto constituiu uma unidade experimental e delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições.

A aplicação do glyphosate foi realizada conforme descrito no experimento II; no entanto, a pulverização foi somente sobre os frutos. A temperatura do ar por ocasião da aplicação foi de 26°C e umidade relativa do ar foi de 80%. Os frutos verdes

apresentavam 5,1 cm de altura e 4,7 cm de diâmetro (cerca de dois meses de idade) e os frutos em fase final de maturação apresentavam 7,0 cm de altura e 6,6 cm de diâmetro (cerca de 8 meses de idade). No campo, durante o estudo, a temperatura média do ar foi de 28°C (± 5) e a umidade relativa média do ar foi de 60% (± 15). No laboratório, a temperatura e umidade relativa foram controladas a 25°C (± 1) e 70% (± 3), respectivamente.

A produção de etileno foi avaliada aos 5 DAA. Nesta época, os frutos foram fechados em recipientes plásticos com volume interno de 500 ml, durante quatro horas. No laboratório, o recipiente foi fechado com uma tampa plástica e, no campo, com um saco plástico amarrado ao pedúnculo do fruto (Figuras 2). No campo, fixou-se uma borracha no saco plástico para permitir a injeção da agulha para retirada da amostra gasosa, sem que ocorresse contaminação com ar externo devido à abertura do orifício no saco plástico. No laboratório a injeção da agulha pôde ser feita diretamente na tampa plástica. A coleta das amostras foi feita ao final das quatro horas de confinamento, injetando-se uma das extremidades da agulha (Vacutainer®) diretamente no recipiente com o fruto, enquanto a outra extremidade permaneceu selada até ser injetada num frasco a vácuo de 5 mL (Vacutainer®, sem aditivo) (Figura 3).

A taxa de produção de etileno foi obtida retirando-se, com auxílio de uma seringa, uma alíquota de 0,5 mL de amostra da composição gasosa do interior dos frascos selados e injetando-a em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC 14-B). O gás de arraste foi o nitrogênio, a um fluxo de 20 mL.minuto⁻¹. As temperaturas mantidas no aparelho foram de 80°C para a coluna, 100°C no injetor e 150°C no detector. Como padrão foi utilizado etileno puro (5 $\mu\text{L.L}^{-1}$), da White Martins. Todos os frutos tiveram a massa e volume determinados logo após a coleta das amostras gasosas. Os resultados foram expressos em pmol.g⁻¹.h⁻¹. O experimento foi conduzido até 30 DAA do glyphosate apenas para quantificar a queda dos frutos.

Figura 2 - Recipiente plástico fechado com saco plástico utilizado para confinamento dos frutos e posterior coleta de amostra gasosa

Figura 3 - Procedimento de coleta da amostra gasosa dos recipientes com frutos confinados, utilizando-se uma agulha de duas extremidades e um frasco com vácuo

5.2.5 Análise dos dados

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

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Experimento I - Queda de frutos em função da aplicação de glyphosate dirigida ao terço basal das plantas

As três doses de glyphosate causaram queda de frutos presentes na região atingida pela pulverização. A queda iniciou-se logo na segunda semana após a aplicação do herbicida. Aos 15 dias após a aplicação (DAA), as doses de 360, 720 e 1080 g e.a.ha⁻¹ de glyphosate causaram 9, 16 e 19% de queda, respectivamente (Figura 4). A queda foi crescente até 45 DAA, após os quais se manteve constante. Aos 60 DAA, a porcentagem de frutos caídos nas duas maiores doses foi de 70% e na menor dose foi de 36%. Nas testemunhas e nas partes das plantas não atingidas pela pulverização de glyphosate não se observou a queda de frutos.

Nenhum sintoma de intoxicação foi observado na planta até o final do estudo, à exceção dos efeitos nos frutos presentes na região atingida pela pulverização. Durante o período não houve emissão de novas brotações, que é quando são observados os principais sintomas de intoxicação por glyphosate (Tucker 1977).

A quase totalidade dos frutos que caíram devido ao glyphosate (93%) apresentou sintoma de dano. O dano se caracterizou por machas levemente amareladas e necrose irregular na casca do fruto, atingindo 20% da área externa do fruto, em média, independentemente da dose (Figura 5). Estes danos estiveram localizados principalmente na região do fruto exposta à aplicação do herbicida. Não se verificou dano interno no fruto. Os sintomas foram constatados quando estes ainda estavam na planta, mas intensificam-se após a queda.

Figura 4 - Porcentagem de queda de frutos em função da dose de glyphosate aplicada dirigida ao terço basal das plantas. ** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade. CV – Coeficiente de variação. As doses na última avaliação acompanhadas de letras distintas diferiram pelo teste de Tukey a 5%. Os pontos representam as médias com seus respectivos erros padrões

Figura 5 - Porcentagem de área da casca dos frutos com sintomas característicos de dano por glyphosate (A) e imagem de fruto com danos (B). As barras representam as médias com seus respectivos erros padrões

A coloração predominante na casca não foi significativamente afetada pelo glyphosate (Figura 6). A metodologia adotada para determinação da coloração não necessariamente caracteriza o amarelecimento provocado pelo herbicida, pois o dano foi localizado em algumas partes do fruto. Embora não tenha ocorrido diferença estatística, os frutos presentes na região atingida pela maior dose de glyphosate tenderam a apresentar coloração mais amarela na época da colheita.

Figura 6 - Coloração predominante da casca dos frutos caídos por dano de glyphosate ou colhidos no final do ensaio em função da dose do herbicida. ^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. CV – Coeficiente de variação. As barras representam as médias com seus respectivos erros padrões

A qualidade dos frutos foi pouco afetada pelos tratamentos (Figura 7). Os tratamentos diferiram apenas para a porcentagem de suco. Os frutos atingidos por 720 g e.a.ha⁻¹ de glyphosate apresentaram quantidade de suco 5% maior que dos outros tratamentos. A diferença obtida foi muito pequena, devendo ter pouca relevância prática. Os tratamentos foram aplicados quando os frutos já estavam em estágio

Figura 7 - Índices tecnológicos da qualidade dos frutos em função da dose de glyphosate. ^{ns}

Não significativo a 5% de probabilidade. CV – Coeficiente de variação. As barras representam as médias com seus respectivos erros padrões

avançado de maturação, resultando em pequenas alterações qualitativas, mesmo na testemunha, desde a aplicação dos tratamentos até a colheita. Na época da aplicação, a porcentagem de suco, acidez titulável, sólidos solúveis totais e ratio dos frutos foram iguais a 52%, 1,13 g ácido cítrico.100 ml⁻¹, 8,3 °Brix e 7,38, respectivamente (dados apresentados no tópico Material e Métodos). Na época da colheita, considerando-se a testemunha, os frutos apresentavam 54% de suco, 1,01 g ácido cítrico.100 mL⁻¹ de acidez titulável, 9,8 °Brix de sólidos solúveis e 9,8 de ratio. Na aplicação dos tratamentos, os frutos já estavam em estágio propício à colheita, já que de acordo com Medina et al. (2005) estes podem ser colhidos com ratio entre 6,5 e 9,0.

A altura e o diâmetro dos frutos na colheita estão apresentados na Figura 8. Não houve diferença entre os tratamentos e, assim como foi observado para as características tecnológicas, o tamanho dos frutos alterou-se pouco entre a aplicação dos tratamentos e a colheita. Antes da aplicação, os frutos tinham 6,98 cm de altura e 6,55 cm de diâmetro, em média. Na colheita, estas mesmas medidas tomadas nas testemunhas foram de 7,21 e 6,79 cm, respectivamente.

Figura 8 - Altura e diâmetro dos frutos colhidos no final do ensaio em função da dose de glyphosate.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade. CV – Coeficiente de variação. As barras representam as médias com seus respectivos erros padrões

5.3.2 Experimento II - Queda de frutos em função da aplicação de glyphosate dirigida aos frutos e/ou folhas

O fato dos danos na casca dos frutos terem se localizado principalmente na região exposta à aplicação indica que o produto que atinge diretamente o fruto tem grande importância na queda. Para confirmar estes indícios, realizou-se um segundo experimento, avaliando-se o efeito do produto que atinge os frutos, as folhas ou frutos + folhas (Figura 9). A queda de frutos foi linearmente crescente a partir doses superiores a 90 g e.a.ha⁻¹ de glyphosate, principalmente quando o herbicida atingiu os frutos. A queda foi pouco significativa para a aplicação atingindo somente as folhas. Portanto, a translocação do herbicida na planta teve pouco efeito na queda de frutos.

Figura 9 - Queda de frutos em função de doses crescentes de glyphosate atingindo os frutos, as folhas ou frutos + folhas. Os pontos representam as médias com seus respectivos erros padrões

5.3.3 Experimento III - Produção de etileno em frutos devido à aplicação de glyphosate

Na Figura 10 estão apresentados os resultados obtidos no ensaio para determinar a produção de etileno em função da aplicação do glyphosate. Não houve diferença significativa na produção de etileno aos 5 DAA do glyphosate entre os frutos mantidos nas plantas e os levados à sala climatizada; portanto, os resultados apresentados referem-se à média destas duas situações.

A produção de etileno pelos frutos verdes não atingidos pelo glyphosate foi seis vezes maior que dos frutos maduros e não foi alterada em função do glyphosate. Consequentemente, até 30 DAA do glyphosate, nenhum fruto verde caiu da planta.

Figura 10 - Produção de etileno por frutos verdes ou maduros atingidos por glyphosate na dose de 720 g e.a.ha⁻¹, aos 5 dias após a aplicação. Barras com letras minúsculas iguais não diferem em cada tipo de fruto e barras com letras maiúsculas iguais não diferem em cada tratamento (Teste de Tukey a 5%). As barras representam as médias com seus respectivos erros padrões

Nos frutos maduros houve significativo aumento na produção de etileno devido ao herbicida. A quantidade de etileno liberada pelos frutos maduros atingidos pelo glyphosate foi bastante desuniforme, conforme pode ser constatado pelo erro padrão da média na Figura 10. Enquanto alguns frutos dobraram sua produção de etileno, outros mantiveram produção semelhante à das testemunhas. Essa variação na produção de etileno pode estar correlacionada com o fato da queda de frutos ser desuniforme ao longo do tempo. A abscisão dos frutos atingidos pelo glyphosate iniciou-se aos 5 DAA, quando ainda não havia sintomas visuais de dano na casca e durou até cerca de 30 DAA. Nos dois experimentos anteriores os frutos caíram em um intervalo maior que 20 dias (principalmente entre 15 e 35 DAA) e nem todos os que foram atingidos pelo glyphosate sofreram abscisão.

5.3.4 Considerações gerais

Trabalhos com outras variedades de citros avaliando a queda de frutos devido ao glyphosate foram conduzidos por Tucker (1977) e Erickson (1996). Os resultados obtidos por estes autores se assemelham aos do presente estudo, havendo dependência de dose alta, fruto com estágio avançado de desenvolvimento e aplicação direta sobre o fruto para que ocorra a queda. Tucker (1977) avaliou frutos com seis semanas e cinco meses de idade, das variedades Pineapple e Valência, submetidos as doses de 1700 e 3300 g e.a.ha⁻¹. Os frutos mais novos não foram afetados por ambas as doses. Houve queda de frutos mais velhos nas duas doses, mas foi mais acentuada na maior delas. O autor também verificou danos na casca dos frutos, localizados principalmente na região atingida pela pulverização. Erickson (1996) constatou efeito positivo do aumento na concentração de glyphosate na queda de frutos de variedades Hamlin, Navel, Ruby Red, Marsh, Pineapple, Valência e Murcott. A resposta das variedades foi diferencial e esteve, em parte, correlacionada com o estágio de maturação dos frutos, já que a aplicação foi feita na mesma época para todas as variedades. As variedades tardias foram menos afetadas. O autor também constatou correlação positiva entre a queda de frutos e o conteúdo de sólidos solúveis totais em

'Hamlin' e que a queda é pouco afetada quando o glyphosate é aplicado somente nas folhas próximas aos frutos.

Durante o processo final de maturação dos frutos cítricos, as modificações mais significativas são as que se processam no conteúdo de sólidos solúveis totais, na acidez titulável e na coloração da casca (CASTRO et al., 2001; MEDINA et al., 2005). O glyphosate não afetou a qualidade interna dos frutos, mas proporcionou alteração na coloração e necrose da casca, principalmente nas regiões diretamente atingidas pela pulverização. Este efeito pode ser atribuído ao estímulo na produção de etileno proporcionado pela ação do glyphosate.

A mudança natural na coloração da casca dos frutos é devido à degradação das clorofilas e à síntese de carotenóides (CASTRO et al., 2001; MEDINA et al., 2005). O etileno pode controlar esse processo em frutos cítricos, tanto que, é comum sua aplicação exógena, após a colheita, visando o desverdecimento para uniformizar a coloração da casca (AWAD; MOREIRA, 1973; CASTRO; FERREIRA; PIO, 1991; WARDOWSKI; NAGY; GRIERSON, 1986). Quando utilizado em doses elevadas, o etileno pode causar efeitos indesejáveis, danificando a casca do fruto (WARDOWSKI; NAGY; GRIERSON, 1986).

A consequência final dos efeitos do glyphosate é a abscisão dos frutos, que também é controlada pelo etileno (ISMAIL, 1969; ISMAIL, 1971; WARDOWSKI; McORNACK, 1973). O estímulo da produção de etileno pode inclusive ser utilizado no desbaste de frutos cítricos pela aplicação exógena de produtos como o ethephon e o etilconazole (CASTRO et al., 2001; GUARDIOLA et al., 1988). Abu-Irmaileh; Jordan e Kumanoto (1979) verificaram estímulo na produção de etileno causado pelo glyphosate em folhas de feijão, correlacionado com o aumento na atividade da enzima celulase. O processo normal de abscisão de folhas e frutos envolve o estímulo pelo etileno da atividade da celulase e outras enzimas que atuam nas zonas de abscisão (REID, 1995; TAIZ; ZEIGER, 1998).

5.4 Conclusões

- O glyphosate aplicado direcionado às plantas de citros promove a queda de frutos em fase final de desenvolvimento;
- Os frutos que caem das plantas devido ao glyphosate geralmente apresentam sintomas característicos de amarelecimento e necrose, principalmente na região atingida pelo herbicida;
- A qualidade tecnológica dos frutos que permaneceram na planta e estavam na região atingida pelo herbicida não foi afetada.
- A queda dos frutos ocorre principalmente devido ao contato direto com a pulverização do glyphosate e não devido à translocação;
- O glyphosate promove a produção de etileno em frutos em fase final de maturação, causando a abscisão.

Referências

ABU-IRMAILEH, B. E.; JORDAN, L. S.; KUMANOTO, T. Enhancement of CO₂ and ethylene production and cellulase activity by glyphosate in *Phaseolus vulgaris*. **Weed Science**, Chichester, v.27, p.103-105, 1979.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. 16th ed. Washington: Patricia CummiFF, 1997. v.2. cap.37. (Métodos 967.21, 943.03, 932.12)

AWAD, M.; MOREIRA, L. O. G. Efeito do ácido 2-cloroetilfosfônico (ethephon) no desverdecimento de laranjas das variedades “Pêra” e “Lima” (*Citrus sinensis* L.). **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.48, n. 2/3, p.111-116, 1973.

CASTRO, J. V.; FERREIRA, V. L. P.; PIO, R. M. Influência da temperatura no desverdecimento e qualidade do tangor Murcote. **Laranja**, Cordeirópolis, v.12, n.1, p.211-224, 1991.

CASTRO, P. R. C.; MARINHO, C. S.; PAIVA, R.; MENEGUCCI, J. L. P. Fisiologia da produção dos citros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.22, n.209, p.26-38, 2001.

ERICKSON, C. G. Management of glyphosate-related citrus fruit drop. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v.109, p.40-42, 1996.

GOREN, R.; TEITELBAUM, G.; RATNER, A. The role of cellulase in the abscission of citrus leaves and fruits in relation to exogenous treatments with growth regulators. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.34, p.359-362, 1973.

GREENBERG, J.; GOREN, R.; RIOV, J. The role of cellulase and polygalacturonase in abscission of young and mature Shamouti orange fruits. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.34, p.1-7, 1975.

GUARDIOLA, J. L.; AGUSTÍ, M.; BARBERÁ, J.; GARCIA-MARI, F. Influencia de las aplicaciones de ácido giberélico durante la brotación en el desarrollo de los agrios. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v.20, p.139-143, 1988.

INIA – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay. **Tabla de Colores para cítricos**. Salto: INIA, [200-].

ISMAIL, M. A. Differential abscission of citrus leaves, mature and immature fruits by ethylene, and cycloheximide. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v.82, p.230-234, 1969.

ISMAIL, M. A. Seasonal variation in bonding force and abscission of citrus fruit in response to ethylene, ethrel, and cycloheximide. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v.84, p.77-81, 1971.

JIMENEZ-CUESTA, M.; CUQUERELLA CAYUELA, J.; MARTINEZ-JAVEGA, J.M. **Teoria y practica de la desverdizacion de los citricos**. Madrid: INIA, 1983. 22p. (Hoja Técnica, 46)

LIMA, J. E. O.; DAVIES, F. S.; KREZDORN, A. H. Factors associated with excessive fruit drop of Navel orange. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.105, p.902-906, 1980.

MEDINA, C. L.; RENA, A. B.; SIQUEIRA, D. L.; MACHADO, E. C. Fisiologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. cap. 7, p. 149 -184.

REID, M. S. Ethylene in plant growth, development and senescence. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.486-508.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1998. 792 p.

TUCKER, D.P.H. Glyphosate injury symptom expression in citrus. **HortScience**, Alexandria, v. 12, n. 5, p. 498-500, 1977.

WARDOWSKI, W. F.; McCORNACK, A. A. Recommendations for degreening Florida fresh citrus fruits. **HortScience**, Alexandria, v.12, n.5, p. 498-500, 1973.

WARDOWSKI, W. F.; NAGY, S.; GRIERSON, S. **Fresh Citrus fruits**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1986. 571p.

YOUNG, R. Relation of ethylene and cellulase activity to abscission of freeze injured citrus fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.97, p.133-135, 1972.

6 TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE LARANJA 'PERA' AO GLYPHOSATE EM FUNÇÃO DA APLICAÇÃO ACIDENTAL COM PULVERIZADOR TRATORIZADO

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de aplicação accidental simulada do glyphosate causar intoxicação e queda de frutos de laranja 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Os tratamentos foram constituídos por concentrações crescentes de glyphosate aplicado com pulverizador tratorizado de forma a atingir os ramos basais de citros até 80 cm de altura das plantas (doses entre 180 a 1440 g e.a.ha⁻¹). Também foram estabelecidas testemunhas mantidas no limpo e no mato. As testemunhas padrões consistiram na aplicação do glyphosate na dose de 1440 g e.a.ha⁻¹, com o jato de aplicação direcionado a atingir somente a base do caule da plantas (até 30 cm de altura), sendo o caule mantido com ou sem proteção. A aplicação do glyphosate atingindo os ramos basais das plantas foi parcialmente interceptada pelas plantas daninhas e não causou qualquer efeito significativo nas plantas de citros. O glyphosate não afetou as concentrações de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenóis totais das folhas, aos 6 dias após a aplicação (DAA); a fluorescência da clorofila *a* (F_v/F_m) aos 6 DAA; o conteúdo de clorofila total entre 15 e 60 DAA; o crescimento de ramos até 60 DAA; e a queda e produção de frutos.

Abstract

Tolerance of citrus plants to glyphosate accidental application with a ground sprayer

This research was conducted to evaluate if an accidental simulated spray of glyphosate can cause toxicity and fruit dropping in *Citrus sinensis* Osbeck var. 'Pera'. The treatments consisted of different concentrations of glyphosate applied with ground sprayer in order to hit the lowers citrus branches up to 80 cm of the plant height (dosages from 180 to 1440 g a.e.ha⁻¹). The control consisted of weedy or weed-free

treatments. The standard control were settled by glyphosate applied at the dosage of $1440 \text{ g a.e.ha}^{-1}$ in order to hit only the basal stem of the plant (up to 30 cm), being the stem maintained with or without protection. The application of glyphosate hitting the citrus braches up to 80 cm of height was partially intercepted by the weeds and did not cause any significant effect on the citrus plants. Glyphosate did not affected the concentrations of shikimate, total free amino acids and total phenolic compounds of the leaves, at 6 days after treatments (DAT); the fluorescence of the chlorophyll a (F_V/F_M) at 6 DAT; the total chlorophyll content from 15 to 60 DAT; the branch growth up to 60 DAT; and the fruit dropping and yield.

6.1 Introdução

Na cultura de citros podem ser adotados diferentes métodos de controle de plantas daninhas aplicados de forma associada ou não. Quando o controle é realizado nas linhas de plantio, o objetivo é minimizar a interferência das plantas daninhas e evitar o crescimento das plantas de grande porte ou trepadeiras que podem afetar os tratos culturais e a colheita. Quando o controle é realizado nas entrelinhas, o objetivo pode ser diferente e existem vantagens decorrentes da preservação da vegetação, seja ela espontânea ou cultivada (DURIGAN; TIMOSSI, 2002; VICTORIA FILHO, 1998).

O controle das plantas daninhas na linha de plantio pelos produtores brasileiros é tradicionalmente feito com herbicidas aplicados em pós-emergência, sem efeito residual no solo, principalmente o glyphosate. No uso deste herbicida, recomenda-se que as partes verdes das plantas não sejam atingidas, evitando-se danos às plantas (TOTH; MORRINSON, 1977; TUCKER, 1977). Relevantes trabalhos com o controle de plantas daninhas com o glyphosate repetido por anos consecutivos não mostraram qualquer efeito negativo causado pelo herbicida nas plantas de citros (CARVALHO et al., 2002; TERSI, 2001; VICTORIA FILHO, 1983).

Tersi (2001) conduziu um experimento por sete anos consecutivos no qual constatou que os tratamentos sem mobilização do solo, incluindo o glyphosate, apresentaram produtividades iguais ou superiores aos demais tratamentos com a mobilização do solo e sem controle de plantas daninhas. Carvalho et al. (2002)

comparou por três safras um sistema com três capinas manuais nas linhas de plantio e três gradagens nas entrelinhas em relação a um sistema com duas aplicações de glyphosate nas linhas de plantio e o plantio de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes*) nas entrelinhas, constatando melhores resultados para a produtividade da cultura em função do sistema com o glyphosate. Victoria Filho (1983), realizando experimentos com uso contínuo de herbicidas em pomares, por um período de cinco anos, constatou que nenhum dos tratamentos herbicidas testados afetou a qualidade e a produção de frutos, inclusive o tratamento com glyphosate.

O objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de aplicação acidental simulada do glyphosate causar intoxicação e queda de frutos de laranja 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck).

6.2 Material e métodos

6.2.1 Localização e condução do estudo

O experimento foi instalado em 01/02/05, em Taquaritinga, SP. O pomar selecionado para o estudo foi plantado no segundo semestre de 2003, com plantas de laranja 'Pera' enxertada sobre limão 'Cravo', com 2,4 metros de altura em média. O espaçamento entre plantas foi de 6 metros nas entrelinhas e 4,5 metros nas linhas.

Antes da instalação do experimento, o manejo de plantas daninhas nas linha de plantio sempre foi realizado com glyphosate na dose de $1440 \text{ g e.a.ha}^{-1}$, com três aplicações anuais (entre outubro e março). Durante a condução do estudo, os tratos culturais, à exceção do manejo de plantas daninhas nas linhas de plantio, foram realizados conforme as práticas normalmente adotadas na propriedade. O manejo de plantas daninhas nas entrelinhas foi realizado com roçadeira convencional. Uma semana antes aplicação dos tratamentos foi feita uma adubação via solo com $1,0 \text{ kg.planta}^{-1}$ da formulação 20-5-20 (NPK). Dois dias após a aplicação dos tratamentos foi realizada uma aplicação com cyexatim ($18,75 \text{ g.100 L}^{-1}$) e 10 dias após foi aplicado aldicarb via solo ($9,0 \text{ g.planta}^{-1}$).

6.2.2 Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos foram constituídos por concentrações crescentes de glyphosate aplicado de forma a atingir os ramos basais de citros até 80 cm de altura. Também foram estabelecidas testemunhas mantidas no limpo e no mato, e tratamentos padrões, baseados na recomendação normal para aplicação do glyphosate. Os tratamentos padrões consistiram na aplicação do glyphosate na dose de 1440 g e.a.ha⁻¹, com o jato de aplicação direcionado a atingir somente a base do caule da plantas até 30 cm de altura, sendo o caule mantido com ou sem proteção até esta altura. O herbicida foi aplicado dos dois lados das plantas de citros, nas linhas de plantio. Para melhor entendimento, os tratamentos experimentais estão apresentados na Tabela 1.

As parcelas experimentais apresentavam quatro plantas, sendo as duas centrais utilizadas para as avaliações. O delineamento foi de blocos casualizados, com três repetições.

Tabela 1 - Tratamentos definidos em função da dose de glyphosate, região da plantas de citros atingida pela pulverização e proteção do caule

Tratamento	Dose (g e.a.ha ⁻¹)	Região da planta atingida	Proteção caule
1 Test. Mato	0	-	-
2 Glyphosate	180	Ramos até 80 cm	Sem
3 Glyphosate	360	Ramos até 80 cm	Sem
4 Glyphosate	720	Ramos até 80 cm	Sem
5 Glyphosate	1440	Ramos até 80 cm	Sem
6 Glyphosate	1440	Caule até 30 cm	Com ¹
7 Glyphosate	1440	Caule até 30 cm	Sem
8 Test. Limpo	Capina	-	-

¹ Proteção com plástico em volta do tronco até 30 cm de altura do solo.

6.2.3 Aplicação dos tratamentos

Os tratamentos foram aplicados quando as plantas daninhas na área apresentavam em média 30 cm de altura, utilizando-se um pulverizador tratorizado, equipado com barra lateral tipo Bentley (MATUO, 1998) para aplicação nas linhas de citros. A barra de pulverização apresentava 3 bicos do tipo TT 110.01 ao longo de sua extensão e um bico do tipo TK 1 em sua extremidade. O bico TK foi regulado para que o jato de aplicação atingisse o terço basal do lado oposto das plantas de citros (80 cm de altura), simulando aplicações acidentais, ou para que atingisse somente a base do caule (30 cm de altura), conforme descrito nos tratamentos. O consumo de calda foi de 200 L/ha e a pressão de pulverização foi de 2,5 bar.

Decorridos 14 dias da aplicação do herbicida, todas as parcelas foram capinadas, à exceção da testemunha no mato, e os restos das plantas daninhas deixados sobre as parcelas.

6.2.4 Avaliações

6.2.4.1 Caracterização da pulverização

Papéis sensíveis a água com 7,5 x 2,5 cm (Ciba-Geigy Corporation) de tamanho foram utilizados para aferir a altura de pulverização que atingiu as plantas de citros. Para tanto, seis papéis sensíveis foram afixados a estacas, em diferentes alturas, até 90 cm. Uma estaca foi colocada em cada parcela, entre duas plantas, na região mediana entre a projeção da copa e o caule das plantas, conforme esquema na Figura 1. Observou-se que a altura máxima atingida pela pulverização, medida por meio dos papéis sensíveis, foi de 80 cm. A interceptação da pulverização pelas plantas daninhas foi estimada calculando-se a porcentagem de papéis sensíveis não atingidos pela pulverização até 80 cm de altura (altura máxima da pulverização). Para este cálculo, consideraram-se todos os papéis que foram atingidos por gotas da pulverização.

Figura 1 - Esquema do posicionamento das estacas com papéis sensíveis visando caracterizar a pulverização do herbicida

6.2.4.2 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram efetuadas em folhas coletadas nas duas plantas centrais de cada parcela, em ramos com frutos de até 4 cm de diâmetro, gerados na primavera, localizados no terço basal (até 80 cm de altura) e mediano de cada planta (entre 80 e 160 cm de altura). Os ramos foram escolhidos apenas nas seções dos lados que receberam a aplicação do herbicida. Coletou-se a terceira e quarta folha de quatro ramos por cada região das plantas, aos 6 e 15 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos. As folhas foram imediatamente resfriadas em caixa de isopor com gelo e

transportadas para o laboratório para serem congeladas em ultrafreezer (-80°C), e, posteriormente, armazenadas em freezer convencional, a -20°C , até a posterior liofilização. Após a liofilização, o material foi moído em micro moinho tipo Willey com peneira de 60 mesh e armazenado em dessecador até utilização para as análises.

Chiquimato

As concentrações de chiquimato foram determinadas conforme metodologia descrita por Singh e Shaner (1998). Para obtenção do extrato, uma amostra com 100 mg de folha liofilizada foi macerada em almofariz com 2 mL de tampão HCl 0,25 N. O extrato foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 30 minutos, e o sobrenadante foi recuperado para a determinação do chiquimato pelo método modificado de Gaitonde e Gordon (1958). Uma alíquota de 20 μL do sobrenadante foi adicionada em 180 μL de água e, posteriormente, misturada a 500 μL de uma solução de ácido periódico 1% para oxidar o chiquimato. Após 3 horas, a amostra foi misturada com 500 μL de hidróxido de sódio 1 N, seguida de 300 μL de glicina 0,1 M e imediatamente feita a leitura em 380 nm em espectrofotômetro. A concentração de chiquimato foi obtida a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de chiquimato.

Aminoácido livres totais e fenóis totais

O extrato para análise de aminoácidos livres totais e fenóis totais foi obtido colocando-se 200 mg de folha liofilizada em tubo de ensaio contendo 3 mL de etanol 80%. Os tubos contendo as amostras em álcool permaneceram por três dias em uma mesa agitadora, dentro de câmara fria (8°C). Após esse período o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 30 minutos, e o sobrenadante foi recuperado.

A determinação dos aminoácidos livres totais foi feita seguindo-se o método de reação colorimétrica dos aminoácidos com ninhidrina (YEMM; COOCKING, 1955). Para tanto, foram adicionados, em tubo de ensaio, 1000 μL do sobrenadante diluído 50 vezes; 500 μL de tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 5,0; 200 μL de ninhidrina 5%, em metil celusolve; 1000 μL de solução de KCN 0,01 M diluída a 2% (v/v) em metil

celusolve. Essa mistura foi levada ao banho térmico durante 20 min a 100°C. Os tubos de ensaios foram fechados para evitar a evaporação da solução. Após o resfriamento, foi adicionado etanol 60%, até completar 4 ml. A leitura foi em espectrofotômetro em 570 nm. A concentração de aminoácidos foi obtida a partir de uma curva padrão com leucina.

Os fenóis totais foram determinados pelo método espectrofotométrico de Swain e Hills (1959). Para tanto, 20 µL do sobrenadante foram diluídos em 3480 µL de água, adicionando-se 250 µL do reagente de Folin Ciocalteau. A mistura foi homogeneizada em agitador vortex e, após três minutos, foram adicionados 500 µL de Na₂CO₃ (17,5 g/50 mL), sendo efetuada nova agitação. Por fim, foram adicionados 750 µL de água e, após agitação, aguardou-se uma hora em bancada para posterior leitura da absorbância a 725 nm. Para os cálculos de concentração em relação à massa seca foi utilizada uma curva padrão com ácido clorogênico.

6.2.4.3 Clorofila e fluorescência

As medidas de clorofila total e fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em folhas previamente demarcadas, apresentando as mesmas características das usadas para as análises bioquímicas. Avaliou-se uma folha em dois ramos de cada um dos terços basais (até 80 cm de altura) e medianos (acima de 80 cm de altura) das duas plantas centrais das parcelas.

Fluorescência

As determinações relativas à emissão de fluorescência da clorofila *a* foram efetuadas aos 6 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos com um fluorímetro portátil (HANSATEC, mod. Plant Efficiency Analyser - PEA), conforme Alves (1998) e Oliveira (2000). A luz de excitação do aparelho utilizada nos ensaios foi padronizada em 3000 µmol.m⁻².s⁻¹ na superfície da folha, correspondente a 100% da intensidade máxima fornecida pelo aparelho. As folhas avaliadas foram pré-adaptadas no escuro por 30 minutos antes das determinações de fluorescência. A adaptação das folhas no

escuro correspondeu a uma área circular do limbo foliar, de quatro milímetros de diâmetro. O parâmetro avaliado foi a razão F_v/F_m (fluorescência variável/fluorescência máxima), que apresenta uma variação típica entre 0,75 e 0,85 e é uma medida do potencial máximo da eficiência quântica fotoquímica do fotossistema II (PS_{II}) (BOLHÁR-NORDENKAMPF; ÖQUIST, 1993).

Clorofila total

Os teores relativos de clorofila total foram determinados aos 15, 30 e 60 DAA por um clorofilômetro manual (Minolta, mod. SPAD 502). O SPAD fornece leituras que se correlacionam com o teor de clorofila presente na folha. Os valores são calculados pela leitura diferencial da quantidade de luz transmitida pela folha, em duas regiões de comprimento de onda (650 nm e 940 nm), e a absorção de luz pela clorofila ocorre no primeiro comprimento de onda (SWIADER; MOORE, 2002)

6.2.4.4 Fitointoxicação e produção de frutos

Durante a condução dos experimentos, os sintomas visuais de intoxicação pelo herbicida foram avaliados periodicamente.

Antes da aplicação dos tratamentos, quatro ramos vegetativos em cada um dos terços da planta foram selecionados para avaliar o crescimento da planta. Cada ramo foi demarcado com um fio de cobre na distância de 10 cm de sua região apical. Periodicamente o fio de cobre foi ajustado ao diâmetro do ramo, evitando-se o estrangulamento do ramo devido ao seu crescimento. Aos 60 DAA mediu-se o tamanho dos ramos a partir da região demarcada.

Quatro ramos com frutos em fase final de desenvolvimento no terço basal e quatro no terço mediano, em cada planta, foram demarcados com fitilhos antes da aplicação. Cada ramo apresentava quatro frutos, em média. A queda dos frutos destes ramos foi avaliada aos 60 DAA. Ao final da safra avaliou-se a produtividade, pesando-se o total de frutos colhidos em cada planta.

6.2.5 Análise dos dados

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

6.3 Resultados e discussão

Por ocasião da aplicação dos tratamentos, as plantas daninhas presentes nas linhas de plantio de citros apresentavam 30 cm de altura em média e, portanto, interceptaram parte da pulverização. A comunidade infestante foi composta predominantemente por capim colchão (*Digitaria horizontalis*) e capim amargoso (*Digitaria insularis*). Do total pulverizado que deveria atingir a parte basal das plantas cultivadas, 42% foram interceptados pelas plantas daninhas, conforme estimativa obtida com os papéis sensíveis. Além destas, o próprio tronco da planta de citros é uma barreira contra a pulverização accidental, embora a quantidade interceptada por ele não tenha sido estimada. Nos tratamentos com pulverização direcionada à base do tronco, seguindo a recomendação para os pomares de citros, nenhum papel sensível foi atingido, comprovando a correta regulagem do equipamento.

Nenhuma das características bioquímicas avaliadas aos 6 e 15 dias após a aplicação (DAA) foi afetada pelos tratamentos, tanto no terço mediano, não atingido, quanto no terço basal, atingido pela pulverização (Tabela 2). Mesmo resultado foi obtido para a eficiência fotossintética da clorofila a (F_V/F_M), determinada aos 6 DAA, e para o teor relativo de clorofila total, medido aos 15, 30 e 60 DAA (Tabela 3).

No Capítulo 3, estas mesmas características foram avaliadas em plantas mais jovens de citros submetidas à aplicação de glyphosate. Plantas de 'Valência' sobre 'Swingle', com apenas 24 meses de idade, submetidas à aplicação de glyphosate na dose de 720 g e.a.ha⁻¹, sobre toda a parte aérea, não apresentaram alteração em suas folhas novas e maduras nos conteúdos de chiquimato, aminoácidos livres totais, fenóis e clorofila total e na fluorescência da clorofila a e, tampouco, sofreram efeito na atividade fotossintética. Neste mesmo capítulo avaliaram-se plantas muito novas de limão 'Cravo', com apenas 4 meses de idade, constatando-se que a dose de 720 g

e.a.ha⁻¹ de glyphosate proporcionou apenas efeito transitórios no chiquimato e aminoácidos livres totais, enquanto todas as demais características acima citadas não foram afetadas. Os resultados destes experimentos mostram que as plantas de citros apresentam grande tolerância ao glyphosate, tanto que o acúmulo de chiquimato, quando constatado, foi pequeno e transitório. Cabe destacar que o acúmulo de chiquimato é considerado um ótimo indicador de intoxicação pelo glyphosate (BAERSON et al., 2002; BECERRIL; DUKE; LYDON, 1989; PLINE et al., 2002; SINGH; SHANER, 1998).

Durante todo o período estudado não foi observado qualquer dano visual de glyphosate nos tecidos já existentes por ocasião da aplicação. O único sintoma observado consistiu na emissão de algumas poucas brotações deformadas nos ramos basais atingidos pela dose de 1440 g e.a.ha⁻¹ cerca de três meses após a aplicação.

A ausência de efeitos do glyphosate nas folhas pré-formadas é normal, já que as plantas eram mais velhas que as estudadas no Capítulo 3 e a pulverização não atingiu toda a parte aérea. Além disso, grande parte da pulverização que potencialmente deveria ter atingido os tecidos verdes das plantas foi interceptada pelas plantas daninhas. Danos visuais bastante significativos causados pelo glyphosate em plantas de citros são descritos por Toth e Morrison (1977) e Tucker (1977). No entanto, os sintomas foram presentes principalmente em doses elevadas aplicadas diretamente às folhagens das plantas de citros, tais como 6,6 kg e.a.ha⁻¹.

Tabela 2 - Concentrações de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenóis totais em folhas de plantas em produção de 'Pera Rio' sobre 'Cravo' em função da aplicação de glyphosate

Tratamento	Dose (g e.a.ha ⁻¹)	Região da Planta Atingida	Proteção Caule	Chiquimato (μmol.g ⁻¹ massa seca)		Aminoácido Livres Totais (mg.g ⁻¹ massa seca)		Fenóis Totais (mg.g ⁻¹ massa seca)	
				6 DAA ²	15 DAA	6 DAA	15 DAA	6 DAA	15 DAA
Terço Mediano									
1 Test. Mato	0	-	-	26,1	27,0	7,4	6,2	16,3	17,1
2 Glyphosate	180	Ramos até 80 cm	Sem	30,7	28,0	7,2	6,3	16,6	17,5
3 Glyphosate	360	Ramos até 80 cm	Sem	29,2	27,2	6,8	6,1	16,6	17,1
4 Glyphosate	720	Ramos até 80 cm	Sem	28,2	26,8	6,0	6,7	16,0	16,1
5 Glyphosate	1440	Ramos até 80 cm	Sem	27,9	25,5	6,6	5,5	16,0	15,8
6 Glyphosate	1440	Caule até 30 cm	Com ¹	25,2	26,3	6,2	6,6	15,8	15,8
7 Glyphosate	1440	Caule até 30 cm	Sem	26,3	25,4	6,2	5,8	16,5	15,5
8 Test. Limpo	Capina	-	-	26,9	24,5	6,2	6,4	16,3	17,5
F	-	-	-	0,76 ^{ns}	0,29 ^{ns}	1,28 ^{ns}	1,57 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,68 ^{ns}
CV (%)	-	-	-	13,0	14,0	12,4	9,1	12,0	10,7
Terço Basal									
1 Test. Mato	0	-	-	18,9	16,3	7,2	5,9	16,6	15,6
2 Glyphosate	180	Ramos até 80 cm	Sem	20,2	20,6	7,2	6,4	16,9	17,3
3 Glyphosate	360	Ramos até 80 cm	Sem	23,9	17,2	7,9	5,8	17,4	15,9
4 Glyphosate	720	Ramos até 80 cm	Sem	18,8	16,3	6,2	5,8	17,7	15,2
5 Glyphosate	1440	Ramos até 80 cm	Sem	18,6	17,8	6,1	6,1	15,7	14,5
6 Glyphosate	1440	Caule até 30 cm	Com ¹	19,2	16,1	5,5	6,2	16,0	14,7
7 Glyphosate	1440	Caule até 30 cm	Sem	18,2	15,3	6,0	6,5	15,3	15,4
8 Test. Limpo	Capina	-	-	19,6	20,6	6,2	6,6	16,2	18,1
F	-	-	-	0,50 ^{ns}	1,27 ^{ns}	2,72 ^{ns}	1,44 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,86 ^{ns}
CV (%)	-	-	-	22,7	19,9	12,9	7,3	12,3	14,6

¹ Proteção com plástico em volta do tronco até 30 cm de altura do solo. ² DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; ns não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação.

Tabela 3 - Teor relativo de clorofila total e eficiência quântica do fotossistema II (PS_{II}) em folhas de plantas em produção de 'Pera Rio' sobre 'Cravo' em função da aplicação de glyphosate

Tratamento	Dose (g e.a. ha ⁻¹)	Região da Planta Atingida	Proteção Caule	Eficiência quântica do PS _{II} (F _V /F _M)	Clorofila Total (ug.cm ⁻²)		
				6 DAA ²	15 DAA	30 DAA	60 DAA
Terço Mediano							
1 Test. Mato	0	-	-	0,800	73,1	76,3	74,7
2 Glyphosate	180	Ramos até 80 cm	Sem	0,789	71,9	75,0	73,4
3 Glyphosate	360	Ramos até 80 cm	Sem	0,811	73,0	74,7	75,8
4 Glyphosate	720	Ramos até 80 cm	Sem	0,813	71,3	72,8	77,1
5 Glyphosate	1440	Ramos até 80 cm	Sem	0,859	67,7	67,3	73,5
6 Glyphosate	1440	Caule até 30 cm	Com ¹	0,813	69,6	69,3	73,7
7 Glyphosate	1440	Caule até 30 cm	Sem	0,814	71,1	71,0	74,1
8 Test. Limpo	Capina	-	-	0,808	69,7	67,3	67,9
F	-	-	-	1,85 ^{ns}	0,28 ^{ns}	1,63 ^{ns}	0,94 ^{ns}
CV (%)	-	-	-	3,2	8,5	6,7	6,5
Terço Basal							
1 Test. Mato	0	-	-	0,815	73,2	76,3	76,6
2 Glyphosate	180	Ramos até 80 cm	Sem	0,785	68,4	69,5	74,9
3 Glyphosate	360	Ramos até 80 cm	Sem	0,802	69,2	71,6	72,1
4 Glyphosate	720	Ramos até 80 cm	Sem	0,818	69,6	74,8	76,4
5 Glyphosate	1440	Ramos até 80 cm	Sem	0,813	70,3	71,0	71,6
6 Glyphosate	1440	Caule até 30 cm	Com ¹	0,817	73,9	73,8	76,8
7 Glyphosate	1440	Caule até 30 cm	Sem	0,817	73,0	72,6	71,3
8 Test. Limpo	Capina	-	-	0,796	76,2	75,3	76,8
F	-	-	-	0,89 ^{ns}	1,48 ^{ns}	1,29 ^{ns}	0,58 ^{ns}
CV (%)	-	-	-	2,7	5,4	4,9	7,6

¹ Proteção com plástico em volta do tronco até 30 cm de altura do solo. ² DAA - Dias após a aplicação dos tratamentos; ^{ns} não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; CV – coeficiente de variação.

O crescimento de ramos somente foi menor no terço mediano das plantas da testemunha mantida no mato durante todo o período de estudo (Figura 2). O glyphosate não causou qualquer efeito no crescimento dos ramos. Portanto, a ausência de controle das plantas daninhas afetou as plantas de citros. A importância do controle do mato para as plantas de citros foi avaliada em trabalhos de competição conduzidos por Blanco e Oliveira (1978); Bortolazzo (2002) e Carvalho; Cardoso e Costa Neto (1993).

Figura 2 - Comprimento dos ramos nos diferentes terços de plantas em produção de 'Pera Rio' sobre 'Cravo' em função da aplicação de glyphosate. * Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade; CV – Coeficiente de variação. Barras com letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os tratamentos não afetaram a queda de frutos até 60 DAA, que ocorreu independentemente da aplicação do herbicida (Figura 3). Grande parte dos frutos caídos foi devida ao ataque de pragas, principalmente do bicho furão (*Ecdytolopha aurantiana*). Consequentemente, não houve efeito dos tratamentos na produtividade (Figura 4).

Figura 3 - Queda de frutos nos terços mediano e basal de plantas de 'Pera Rio' sobre 'Cravo' em função da aplicação de glyphosate. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade; CV – Coeficiente de variação

Figura 4 - Produção de plantas de 'Pera Rio' sobre 'Cravo' em função da aplicação de glyphosate. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade; CV – Coeficiente de variação

Frutos cítricos em estádios finais de desenvolvimento são bastante susceptíveis ao glyphosate aplicado diretamente a eles, conforme constatado nos trabalhos de Erickson (1996); Tucker (1977) e no Capítulo 5 desta tese. Inclusive, as evidências mostram que o herbicida promove a produção de etileno, causando a posterior abscisão. A ausência de efeito da aplicação accidental simulada neste trabalho pode ser devido à interceptação de parte do herbicida pelas plantas daninhas e pelas folhas e ramos da própria planta de citros. Os resultados obtidos no Capítulo 5 mostram que a queda de frutos é causada majoritariamente pelo contato direto do herbicida, havendo pouco ou nenhum efeito devido à translocação das folhas para os frutos. De qualquer forma, deve-se ressaltar que as plantas testadas eram relativamente novas e apresentaram baixa produtividade (Figura 4). Plantas com maior produção devem apresentar maior quantidade de frutos expostos às aplicações accidentais de glyphosate,

podendo haver queda significativa de frutos. Nestas situações é importante tomar medidas preventivas para se evitar que o glyphosate atinja os frutos.

6.4 Conclusões

- De acordo com as condições estudadas, a aplicação acidental de glyphosate atingindo as plantas de citros não afetou os conteúdos foliares de chiquimato, aminoácidos livres totais e fenois totais; o teor relativo clorofila total; a fluorescência da clorofila *a* (F_V/F_M); o crescimento de ramos; e a queda e produção de frutos.

Referências

ALVES, P.L.C.A. **Comportamento fotossintetico de duas espécies de eucalipto sob condições fotoinibitórias**: alterações fotoquímicas em resposta a alta irradiância e baixa temperatura. 1998. 176 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

BAERSON, S. R.; RODRIGUEZ, D. J.; BIEST, N. A.; TRAN, M.; YOU, J.; KREUGER, R. W.; DILL, G. M.; PRATLEY, J. E.; GRUYS, K. J. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Champaign, v.50, p.721-730, 2002.

BECERRIL, J. M.; DUKE, S. O.; LYDON, J. Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medic.). **Phytochemistry**, Oxford, v.28, p.695-699, 1989.

BLANCO, H. G.; OLIVEIRA, D. A. Estudos dos efeitos da época de controle do mato sobre a produção de citros e a composição da flora daninha. **Arquivos do Instituto Biológico**, Campinas, v.45, n.1, p.25-36, 1978.

BOLHÁR-NORDENKAMPF, H. R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D. O., SCURLOCK, J. M. O., BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R., LEEGOOD, R. C. AND LONG, S. P. (Ed.). **Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman and Hall, 1993. p.193-206.

BORTOLAZZO, E.D. **Efeitos da área de controle das plantas daninhas (coroamento ou faixa) no desenvolvimento inicial de tangerina “Poncã” (*Citrus reticulata* Blanco)**. 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

CARVALHO, J. E. B.; CARDOSO, S. S.; COSTA NETO, A. O. Influência das épocas de controle das plantas daninhas sobre a produção de laranja-'Pêra'. **Planta Daninha**, Brasília, v.11, n.1-2, p.49-54, 1993.

CARVALHO, J.E.B.; SOUZA, L.S.; CALDAS, R.C.; ANTAS, P.E.U.T.; ARAÚJO, A.M.A.; LOPES, L.C.; SANTOS, R.C.; LOPES, N.C.; SOUZA, A.L.V. Leguminosa no controle integrado de plantas daninhas para aumentar a produtividade da laranja-'Pêra'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.82-85, 2002.

DURIGAN, J.C.; TIMOSSI, P.C. **Manejo de plantas daninhas em pomares cítricos**. Bebedouro: EECB, 2002. 52p. (Boletim Citrícola, 22)

ERICKSON, C. G. Management of glyphosate-related citrus fruit drop. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v.109, p.40-42, 1996.

GAITONDE, M.; GORDON, M. A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.230, p.1043-1050, 1958.

MATUO, T. Tecnologia de aplicação de herbicidas em pomares cítricos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS – TRATOS CULTURAIS, 5., 1998, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Fundação Cargill, 1998. p.349-355.

OLIVEIRA, J.G. **Efeitos fisiológicos da fotoinibição da fotossíntese em plantas jovens de cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** 2000. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

PLINE, W. A.; WILCUT, J. W.; DUKE, S. O.; EDMISTEN, K. L.; WELLS, R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.506-512, 2002.

SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v.12, p.527-530, 1998.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.10, p.63-68, 1959.

SWIADER, J.M.; MOORE, A. SPAD - chlorophyll response to nitrogen fertilization and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.25, p.1089-1100, 2002.

TERSI, F.E.A. **Avaliação de métodos de manejo do solo e de plantas daninhas em um pomar de laranja Valência.** 2001. 78p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2001.

TOTH, J.; MORRISON, G. Glyphosate drift damages fruit trees. **Agricultural Gazette of New South Wales**, Sydney, v.88, p.44-45, 1977.

TUCKER, D.P.H. Glyphosate injury symptom expression in citrus. **HortScience**, Alexandria, v.12, n.5, p.498-500, 1977.

VICTORIA FILHO, R. **Efeitos do uso contínuo de herbicidas no desenvolvimento, produção e qualidade dos frutos de dois cultivares de citros (*Citrus sinensis* (L.) Orbeck)**. 1983. 232p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983.

VICTORIA FILHO, R. Manejo de plantas daninhas em citros no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS – TRATOS CULTURAIS, 5., 1998, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Fundação Cargill, 1998. p.357-376.

YEMM, E.M.; COOKING, E.C. Estimation of amino acids by ninhydrin. **Analyst**, London, v.80, p.209-213, 1955.