



## Fixação biológica do nitrogênio em soja transgênica e aplicação de glifosato durante três safras consecutivas no Brasil.

**André Shiqueyoshi Nakatani<sup>(1)</sup>; Mariangela Hungria<sup>(2)</sup>; Marcelo Fernandes<sup>(3)</sup>; Iêda Carvalho Mendes<sup>(4)</sup>; Fábio Bueno dos Reis-Junior<sup>(4)</sup>; Maria Cristina Neves de Oliveira<sup>(2)</sup>**

<sup>(1)</sup> Bolsista de pós-doutorado PNPd/CNPq, Embrapa Soja, Londrina, PR, andrenakatani@yahoo.com.br; <sup>(2)</sup> Pesquisadora, Embrapa Soja, Londrina, PR, mariangela.hungria@embrapa.br; <sup>(3)</sup> Pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, marcelo.fernandes@embrapa.br; <sup>(4)</sup> Pesquisadores, Embrapa Cerrados, Planaltina, DF.

**RESUMO:** A fixação biológica do nitrogênio (FBN) desempenha papel importante na agricultura tropical contribuindo para a rentabilidade e sustentabilidade da cultura da soja no Brasil. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do cultivo da soja transgênica e da aplicação do glifosato sobre a FBN em seis locais do Brasil, por três safras consecutivas. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com cinco tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram: T1: soja transgênica + glifosato; T2: soja transgênica + herbicidas convencionais; T3: soja parental convencional + herbicidas convencionais; T4: soja transgênica + capina manual; T5: soja parental convencional + capina manual, com três pares de cultivares em cada local estudado, totalizando 15 tratamentos. As plantas foram coletadas nos estágios V4 e R2 para a avaliação de atributos da FBN. A análise do contraste 1 mostrou que a transgenia afetou negativamente os parâmetros da FBN (3 das 6 variáveis), principalmente a massa seca de nódulos, a % N-ureído (%NU) e o conteúdo total de N-ureído (TNU). Não houve diferenças consistentes entre o uso de glifosato e herbicida convencional (Contraste 2). Em três locais o uso do glifosato resultou em maiores TNU e N total na parte aérea. Com relação ao tipo de manejo (Contraste 3), apenas a %NU foi afetada negativamente pelos tratamentos transgênico+glifosato em 3 dos 6 locais (Passo Fundo, Londrina e Planaltina). Conclui-se que a FBN não difere entre o cultivo com soja transgênica + aplicação de glifosato em relação à soja convencional + herbicida convencional.

**Termos de indexação:** FBN; biossegurança; soja RR

### INTRODUÇÃO

O cultivo de plantas transgênicas iniciou-se em 1996 nos Estados Unidos e, atualmente, a área plantada com essas cultivares no mundo é estimada em 75 milhões de ha. O Brasil é o segundo país em área cultivada com soja transgênica, com 18 milhões de hectares em 2010 (James, 2010).

A utilização de cultivares geneticamente modificadas e de herbicidas específicos tem gerado preocupação em relação aos impactos sobre a

fixação biológica do nitrogênio (FBN) na cultura da soja. É importante que os avanços biotecnológicos que têm permitido a obtenção de soja resistente a herbicidas sejam acompanhados por rigorosos estudos de segurança ambiental para garantir não apenas o mínimo de impacto ao ambiente, mas também para garantir os benefícios já consolidados obtidos por pesquisas científicas, como os da FBN. Em 2010, foi estimado que o uso de inoculação com bactéria fixadora de N<sub>2</sub> na cultura da soja no Brasil foi responsável por uma economia anual de, aproximadamente, US\$ 9 bilhões, pelo não uso de fertilizantes nitrogenados, além dos benefícios ambientais.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do cultivo de soja transgênica com aplicação de glifosato sobre atributos relativos à FBN em seis locais do Brasil durante três safras consecutivas.

### MATERIAL E MÉTODOS

As avaliações foram realizadas em ensaios conduzidos com soja convencional parental e soja transgênica com tolerância ao herbicida glifosato. Os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos ao acaso, com seis repetições, em sistema de plantio direto, nas safras 2003/2004; 2004/2005 e 2005/2006, em seis locais: Londrina (PR), Ponta Grossa (PR), Passo Fundo (RS), Uberaba (MG), Planaltina (DF) e Luiz Eduardo Magalhães (BA); na primeira safra não houve experimento em Ponta Grossa. Os tratamentos foram: T1: soja transgênica + glifosato (2,0 L/ha, 20 a 30 dias após a emergência); T2: soja transgênica + herbicidas convencionais (de acordo com recomendação técnica); T3: soja parental convencional + herbicidas convencionais; T4: soja transgênica + capina manual; T5: soja parental convencional + capina manual. Em cada local foram utilizados três pares de cultivares, totalizando 15 tratamentos.

Na Região Sul foram utilizadas as cultivares Conquista/Valiosa RR (substituída por Embrapa 58/BRS242RR nas safras 2004/05 e 2005/06) (Cultivar 1=C1); BRS133/BRS245RR (Cultivar 2=C2); Embrapa 59/BRS244RR (Cultivar 3=C3). Na

Região Central foram utilizadas as cultivares Conquista/ValiosaRR (Cultivar 1=C1); BRS133/BRS245RR (substituída por Celeste/BalizaRR nas safras 2004/05 e 2005/06) (Cultivar 2=C2); Jataí/SilvâniaRR (Cultivar 3=C3).

As sementes de soja foram inoculadas com inoculante turfoso contendo  $10^9$  células/g das estirpes *B. elkanii* SEMIA 587+ *B. diazoefficiens* SEMIA 5080. A semeadura foi manual, com 25 a 30 sementes viáveis por metro linear, com espaçamento de 0,5 m. As parcelas experimentais tinham 5,0 m x 6,0 m (área útil de 2 x 3 m) e distanciadas em 1,0 m.

No estágio V4 e R2, foram coletadas 10 plantas de cada parcela para avaliação de atributos relativos à FBN: massa seca de nódulos (MSNV4 e MSNR2); concentração de nitrogênio na parte aérea (NPAR2); nitrogênio total na parte aérea (NTPAR2); % de N-ureído (%NUR2) e conteúdo total de N-ureído (TNUR2).

Os dados foram submetidos à análise de variância, depois de avaliadas as pressuposições de normalidade e independência dos resíduos, aditividade do modelo e homogeneidade de variância dos tratamentos. O teste de contrastes foi utilizado para a comparação do efeito do evento transgênico e do glifosato sobre os atributos relativos à FBN. Os contrastes foram os seguintes (C = cultivar): transgênicos X não transgênicos (tratamentos com herbicida convencional e capina) (T2-C1, C2 e C3, T4-C1, C2 e C3 X T3-C1, C2 e C3, T5-C1, C2 e C3), transgênico com glifosato x transgênico com herbicida convencional (T1-C1, C2 e C3 X T2-C1, C2 e C3) e transgênico com glifosato X não transgênico com herbicida convencional (T1-C1, C2 e C3 X T3-C1, C2 e C3). A significância dos contrastes foi comparada pelo teste *t* de Student ( $p \leq 0,05$ ). Adicionalmente, os dados foram submetidos à análise estatística multivariada para avaliar o efeito da transgenia e do tipo de herbicidas sobre a eficiência simbiótica, descrita pela análise simultânea das seis variáveis da FBN, pela ordenação em escala multidimensional não-métrica (NMS) (Sokal, 1979). Antes da análise os dados foram padronizados e o número de dimensões foi selecionado considerando o critério de estresse e estabilidade das soluções gráficas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transgenia afetou vários parâmetros de FBN (pelo menos três das seis variáveis) (Tabela 1). A MSNR2 foi o atributo mais negativamente afetado pela transgenia, com reduções variando entre 10% a 21%, em quatro dos seis locais. Os menores valores de MSNR2 foram observados em Ponta Grossa,

Londrina e Planaltina, mas não em Passo Fundo e foram congruentes com o decréscimo na %NU nas cultivares transgênicas. Nenhum efeito da transgenia foi observado na FBN em Uberaba (Tabela 1). Os efeitos negativos pontuais do evento transgênico sobre alguns atributos da FBN podem ser atribuídos a alterações nos exsudados radiculares e na fisiologia da planta transgênica (Lynch et al., 2004), que podem afetar o crescimento das bactérias fixadoras de nitrogênio (Kremer & Means, 2009), assim como o funcionamento da simbiose (Montero et al., 2001).

Não foram verificadas diferenças consistentes entre os herbicidas (glifosato ou convencional) sobre a FBN (contraste 2, Tabela 2). Embora os tratamentos com glifosato tenham tido, em geral, médias superiores nos parâmetros de FBN, aumentos significativos devido ao glifosato foram dependentes da região e da variável analisada, e foram observadas somente em R2 para NTPA (de 12% a 49%, em três locais), %NU (cerca de 4%, em dois locais) e TNU (17 a 22%, em três regiões). Por outro lado, as plantas tratadas com herbicidas convencionais tiveram maiores %NU em Passo Fundo e Uberaba (aumentos relativos de 1% a 3%). Em Planaltina, nenhum efeito dos herbicidas sobre a FBN foi observado (Tabela 2). De acordo com Procópio et al. (2004), o glifosato é menos tóxico ao crescimento do *Bradyrhizobium* que outros herbicidas como imazethapir e fomesan.

A comparação entre o manejo convencional da soja e o manejo com soja transgênica e aplicação de glifosato (contraste 3, Tabela 3) mostraram que, em geral, a FBN não foi afetada pelo sistema de manejo. Efeitos mais marcantes foram verificados apenas para %NU em Passo Fundo, Londrina e Planaltina, onde maiores valores foram registrados para o manejo convencional da soja (aumentos relativos entre 3% e 5%). Em Uberaba e Luiz E. Magalhães, nenhum efeito do tipo de manejo foi observado sobre a FBN (Tabela 3).

A análise multivariada mostrou que cerca de 93% da variabilidade total dos dados das 6 variáveis da FBN foram representadas em 2 dimensões, de acordo com a ordenação NMS (Fig. 1). O eixo 1 explicou 32,7% da variabilidade dos dados e foi positivamente correlacionado ( $p < 0,001$ ) com todas as variáveis da FBN: MSNV4 ( $r=0,89$ ); MSNR2 ( $r=0,73$ ); %NUR2 ( $r=0,48$ ); TNUR2 ( $r=0,18$ ); MSPAR2 ( $r=0,13$ ) e %NPAR2 ( $r=0,09$ ). De acordo com a NMS, as diferenças na FBN foram associadas com as regiões (Sul e Central), fortemente e positivamente correlacionadas com a MSN em V4 e R2. As áreas da região central (Uberaba, Planaltina e Luiz Eduardo Magalhães) foram plotadas no lado direito, enquanto áreas da

região sul (Passo Fundo, Londrina e Ponta Grossa) foram plotadas no lado esquerdo do eixo 1 (Fig. 1A), mostrando que a MSN aumentou das áreas do sul para a central. O eixo 2 da NMS explicou 60,1% da variabilidade dos dados e foi correlacionado ( $p < 0,001$ ) com TNUR2 ( $r=0,93$ ); NTPAR2 ( $r=0,92$ ); %NPAR2 ( $r=0,56$ ); MSNR2 ( $r=0,42$ ) e %NUR2 ( $r=0,34$ ). Ao longo desse eixo, alterações na FBN foram associadas com as safras dentro de cada região (Sul e Central). Na região Sul, a safra 2005/2006 foi plotada na parte superior, e as safras 2003/2004 e 2004/2005 foram dispostas na parte inferior (Fig. 1B). Nas áreas da região central, foi observado comportamento oposto.

Os resultados mostram que os atributos da FBN são mais influenciados pelas variações locais e de safra (Fig. 1A e B) do que simplesmente pela transgenia ou pelo uso de glifosato (Tabela 3). Segundo Pline-Srnic (2005), o uso de soja transgênica e glifosato causam efeitos mínimos quando comparados aos causados por outros fatores, como tipo de solo, local, safra, ano, cultivar, estágio de desenvolvimento da planta.

### CONCLUSÕES

A comparação entre as cultivares transgênicas e parentais não-transgênicas mostra que a transgenia afeta negativamente algumas variáveis da FBN, principalmente a MSN e a %NU.

O cultivo da soja transgênica com aplicação do glifosato quando comparado à soja e herbicidas convencionais, não afeta a eficiência simbiótica,

avaliada por um conjunto de atributos relacionados à FBN.

### REFERÊNCIAS

- JAMES, C. A global overview of biotech (GM) Crops: Adoption, impact and future prospects. *GM Crops*, 1:8-12, 2010.
- KREMER, R. & MEANS, N., 2009. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *European Journal of Agronomy*. 31, 153-161.
- LYNCH, J., BENEDETTI, A., INSAM, H., NUTI, M., SMALLA, K., TORSVIK, V., NANNIPIERI, P., 2004. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology Fertility of Soils* 40, 363-385.
- MONTERO, F.A., FILIPPI, K.M., SAGARDOY, M.A., 2001. Nodulación y nutrición nitrogenada en sojas convencionales y resistentes a glifosato inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum*. *Ciencia del Suelo* 19, 159-162.
- PLINE-SRNIC, W., 2005. Technical performance of some commercial glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science* 61, 225-234.
- SOKAL, R., 1979. Testing statistical significance of geographic-variation patterns. *Systematic Zoology*. 28, 227-232.
- PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J.B.; JACQUES, R.J.S.; KASUYA, M.C.M.; SILVA, A.A., WERLANG, R.C., 2004. Crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium* sob influência dos herbicidas glyphosate potássico, fomesafen, imazethapyr e carfentrazone-ethyl. *Revista Ceres* 51, 179-188.

**Tabela 1.** Análise de contrastes comparando tratamentos com soja transgênica e não-transgênica (contraste 1) para os parâmetros de FBN, na média de três safras, em seis locais do Brasil.

Local	Contraste	Estágio de desenvolvimento da soja					
		V4	-----R2-----	MSN	MSN	%NPA	NTPA
Passo Fundo	Transgênico	0,66	1,19	39,60	2848,51	72,80	2103,26
	Não-transgênico	0,77	1,46**	39,29	3297,16	72,73	2428,10
Ponta Grossa <sup>†</sup>	Transgênico	0,77	1,46	46,38	9591,89	77,65	7350,75
	Não-transgênico	0,90**	1,85**	45,65	10492,02	79,03*	8169,61
Londrina	Transgênico	0,26	0,77	42,47	4768,73	74,10	3511,84
	Não-transgênico	0,29	0,86*	42,69	5280,21*	77,91**	4110,06**
Uberaba	Transgênico	1,58	2,74	45,14	5283,34	80,67	4306,48
	Não-transgênico	1,52	2,76	44,52	5391,86	80,53	4362,82
Planaltina	Transgênico	1,47	2,15	47,31	4671,98	77,83	3669,58
	Não-transgênico	1,52	2,46*	47,94	5449,75	84,94**	4632,10*
Luiz Eduardo Magalhães	Transgênico	1,09	3,16	44,49	4802,00	78,74	3824,46
	Não-transgênico	1,19	3,36	45,27	5462,77*	80,10	4391,47*

\*\*  $p < 0,005$  \*  $p < 0,05$ . <sup>†</sup> Este local foi avaliado somente nas safras 2004/2005 e 2005/2006. MNS (mg planta<sup>-1</sup>); %NPA (mg N planta<sup>-1</sup>); NTPA (mg N planta<sup>-1</sup>); %NU (%); TNU (mg N-uréido planta<sup>-1</sup>).

**Tabela 2.** Análise de contrastes comparando tratamentos com soja transgênica com glifosato e herbicida convencional (contraste 2) para os parâmetros de FBN, na média de três safras em seis locais do Brasil.

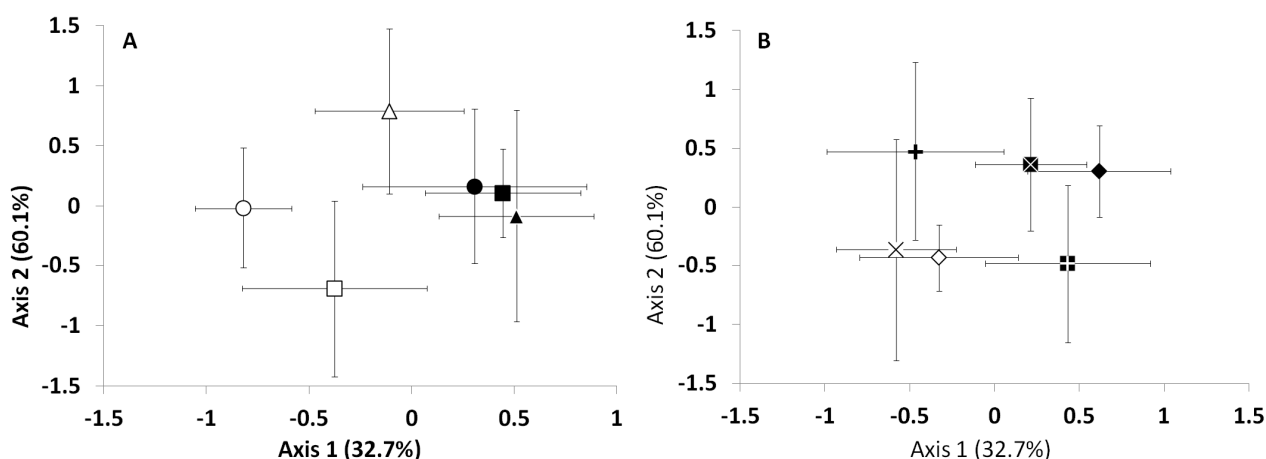
Local	Contraste	Estágio de desenvolvimento da soja					
		V4			R2		
		MSN	MSN	%NPA	NTPA	%NU	TNU
Passo Fundo	Glifosato	0,72	1,29	40,76	3651,44**	69,64	2576,59*
	Herbicida convencional	0,66	1,11	38,31	2443,37	71,42*	1771,38
Ponta Grossa <sup>†</sup>	Glifosato	0,77	1,63	47,29	9683,20	81,87**	7715,54
	Herbicida convencional	0,76	1,50	45,71	8597,17	78,60	6685,19
Londrina	Glifosato	0,28	0,83	43,70	5368,17*	73,03	3932,75*
	Herbicida convencional	0,24	0,73	42,50	4580,97	73,69	3357,67
Uberaba	Glifosato	1,62	2,61	44,51	5552,90*	77,69	4357,11
	Herbicida convencional	1,56	2,76	44,88	4976,10	78,49*	3925,13
Planaltina	Glifosato	1,58	2,21	47,97	5477,55	79,71	4407,38
	Herbicida convencional	1,47	2,09	47,33	4769,00	80,01	3853,33
Luiz Eduardo Magalhães	Glifosato	1,11	3,40	44,51	5391,56	83,08**	4535,04*
	Herbicida convencional	1,11	3,03	44,40	4608,63	79,58	3714,93

\*\* p<0,005 \* p<0,05. <sup>†</sup> Este local foi avaliado somente nas safras 2004/2005 e 2005/2006. MNS (mg planta<sup>-1</sup>); %NPA (mg N planta<sup>-1</sup>); NTPA (mg N planta<sup>-1</sup>); %NU (%); TNU (mg N-ureído planta<sup>-1</sup>).

**Tabela 3.** Análise de contrastes comparando o manejo da soja transgênica com glifosato contra a soja não-transgênica com herbicida convencional (contraste 3) para os parâmetros de FBN, na média de três safras em seis locais do Brasil.

Local	Contraste	Estágio de desenvolvimento da soja					
		V4			R2		
		MSN	MSN	%NPA	NTPA	%NU	TNU
Passo Fundo	Transgênico + Glifosato	0,72	1,29	40,76	3651,44**	69,64	2576,59
	Não-Transgênico + Herbicida convencional	0,78	1,42	38,11	2845,40	72,85**	2102,09
Ponta Grossa <sup>†</sup>	Transgênico + Glifosato	0,77	1,63	47,29	9683,20	81,87	7715,54
	Não-Transgênico + Herbicida convencional	0,89*	1,90	45,21	9605,93	80,75	7645,49
Londrina	Transgênico + Glifosato	0,28	0,83	43,70	5368,17	73,03	3932,75
	Não-Transgênico + Herbicida convencional	0,30	0,79	42,63	5028,36	75,37*	3767,52
Uberaba	Transgênico + Glifosato	1,62	2,61	44,51	5552,90	77,69	4357,11
	Não-Transgênico + Herbicida convencional	1,48	2,79	44,61	5192,74	77,90	4059,46
Planaltina	Transgênico + Glifosato	1,58	2,21	47,97	5477,55	79,71	4407,38
	Não-Transgênico + Herbicida convencional	1,50	2,42	47,77	5357,83	83,96**	4453,34
Luiz Eduardo Magalhães	Transgênico + Glifosato	1,11	3,40	44,51	5391,56	83,08	4535,04
	Não-Transgênico + Herbicida convencional	1,20	3,36	44,74	5112,76	81,74	4201,87

\*\* p<0,005 \* p<0,05. <sup>†</sup> Este local foi avaliado somente nas safras 2004/2005 e 2005/2006. MNS (mg planta<sup>-1</sup>); %NPA (mg N planta<sup>-1</sup>); NTPA (mg N planta<sup>-1</sup>); %NU (%); TNU (mg N-ureído planta<sup>-1</sup>).



**Figura 1.** Ordenação NMS dos parâmetros de FBN de acordo com local e safra. A % da variância representada por cada eixo é mostrada entre parênteses. Figura A: Passo Fundo (quadrado), Ponta Grossa (triângulo), Londrina (círculo), Uberaba (quadrado escuro), Planaltina (triângulo escuro) e Luiz Eduardo Magalhães (círculo escuro). Figura B: Safra 2003/2004 região Sul (losango), Safra 2004/2005 região Sul (símbolo X), Safra 2005/2006 região Sul (símbolo +), Safra 2003/2004 região Central (losango escuro), Safra 2004/2005 região Central (símbolo X escuro), Safra 2005/2006 (símbolo + escuro). Barras horizontais e verticais indicam  $\pm 1$  desvio padrão.