

LETÍCIA SAYURI SUZUKI

**CRESCIMENTO, TEORES DE LIGNINA E FENÓIS TOTAIS EM PLÂNTULAS
DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) CONVENCIONAL E TRANSGÊNICA, SOB
INFLUÊNCIA DO ÁCIDO FERÚLICO E DO GLIFOSATO**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LETÍCIA SAYURI SUZUKI

**CRESCIMENTO, TEORES DE LIGNINA E FENÓIS TOTAIS EM PLÂNTULAS
DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) CONVENCIONAL E TRANSGÊNICA, SOB
INFLUÊNCIA DO ÁCIDO FERÚLICO E DO GLIFOSATO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2006**

LETÍCIA SAYURI SUZUKI

**CRESCIMENTO, TEORES DE LIGNINA E FENÓIS TOTAIS EM PLÂNTULAS
DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) CONVENCIONAL E TRANSGÊNICA, SOB
INFLUÊNCIA DO ÁCIDO FERÚLICO E DO GLIFOSATO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em: ____ de fevereiro de 2006.

Prof. Dr. Tadeu Takeyoshi Inoue

Prof. Dr. Telmo Antônio Tonin

Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes
Lúcio Ferrarese (Conselheira)

Prof. Dr. Alessandro de Lucca e
Braccini (Conselheiro)

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho
(Orientador)

À minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu infinito amor.

À Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho, pela orientação competente, pela confiança e, acima de tudo, pela importante contribuição para a minha formação científica.

À Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Lúcio Ferrarese, pela orientação e acompanhamento, que muito contribuiu ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Alessandro de Lucca e Braccini, pelos ensinamentos transmitidos, pela oportunidade de participação em outros trabalhos que muito acrescentaram à minha formação, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Telmo Antônio Tonin, pelas sugestões, aconselhamentos, incentivo e amizade.

Às colegas Grisiely Ströher Neves, Edicléia Aparecida Bonini e, especialmente, à Patrícia da Costa Zonetti, pelo auxílio nos experimentos e análises, pelas sugestões e pela amizade.

Às Técnicas do Laboratório de Bioquímica Vegetal, Aparecida Maria Dantas, Gisele Adriana Bubna e Gisele Nowakovski, pelo auxílio nos experimentos.

Aos meus pais, Kenji e Ivone Suzuki, minha irmã e meu cunhado, Cybelle e Flávio Deganutti, pelo apoio e incentivo constantes.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Letícia Sayuri Suzuki, filha de Kenji e Ivone Mitsue Suzuki, nasceu em Maringá - PR, no dia 22 de maio de 1978.

Cursou o Ensino Fundamental no Colégio Regina Mundi e concluiu o Ensino Médio no Colégio Platão, em Maringá, no ano de 1995.

Graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá, em dezembro de 1999.

Concluiu curso de Especialização em Bioquímica Aplicada, pela mesma Universidade, em fevereiro de 2001.

Concluiu o Mestrado em Bioquímica, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, em fevereiro de 2003.

Em março de 2003, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá – PR e apresentou-se à Banca Examinadora para defesa em fevereiro de 2006.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Efeitos bioquímicos do glifosato nas plantas	4
2.2 Desenvolvimento da soja transgênica	5
2.3 Métodos de identificação de material transgênico	8
2.3.1 Bioensaios	8
2.3.2 ELISA	10
2.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	11
2.3.4 Testes bioquímicos	11
2.4 Compostos fenólicos – visão geral	14
2.4.1 Distribuição dos compostos fenólicos no solo	18
2.5 Efeitos do ácido ferúlico nas plantas	18
2.5.1 Efeitos na absorção de nutrientes minerais e na utilização da água	19
2.5.2 Efeitos na fotossíntese e síntese protéica	20
2.5.3 Efeitos sobre a composição de carboidratos e ácidos graxos das raízes	21
2.5.4 Efeitos na lignificação	21
2.5.5 Efeitos sobre a atividade de enzimas	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Material e condução experimental	25
3.2 Obtenção do tegumento das sementes	25
3.3 Obtenção das plântulas	25
3.4 Sistema experimental	26
3.5 Composição da solução nutritiva tamponada	27

3.6	Tratamentos utilizados	27
3.7	Determinação do crescimento, biomassa fresca e biomassa seca das raízes	28
3.8	Determinação do teor de lignina	28
3.9	Determinação do teor de fenóis totais	29
3.10	Análise estatística	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Teores de lignina e de fenóis totais no tegumento das sementes	31
4.2	Influência do ácido ferúlico 1 mm sobre a soja convencional e transgênica em quatro períodos de incubação	33
4.2.1	Influência no crescimento e nas biomassas frescas e secas	33
4.2.2	Influência na lignificação	41
4.2.3	Considerações finais	43
4.3	Influência do tratamento com glifosato no crescimento, nas biomassas fresca e seca, nos teores de lignina e de fenóis totais das raízes, após 48 horas de incubação	44
5	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICE	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química da solução nutritiva	27
Tabela 2	Teor de lignina (mg LTGA g tegumento ⁻¹) e fenóis totais (mg g tegumento ⁻¹) dos tegumentos das sementes das cultivares CD-201 e CD-214RR	32
Tabela 3	Crescimento médio (cm) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, controle (C) e tratamento (AF) com ácido ferúlico 1 mM por 24, 48, 72 e 96 horas de incubação	33
Tabela 4	Médias de biomassa fresca das raízes (g plântula ⁻¹) das cultivares CD-201 e CD-214RR, controle (C) e tratamento (AF) com ácido ferúlico, por 24, 48, 72 e 96 horas de incubação	36
Tabela 5	Médias da biomassa seca das raízes (g plântula ⁻¹) das cultivares CD-201 e CD-214RR, controle (C) e tratamento (AF) com ácido ferúlico, em 24, 48, 72 e 96 horas de incubação	38
Tabela 6	Teor de lignina (mg LTGA g raiz ⁻¹) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, controle (C) e tratamento (AF) com ácido ferúlico, em 24, 48, 72 e 96 horas de incubação	41
Tabela 7	Crescimento médio (cm) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, submetidas ou não ao tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM, ou glifosato 0,5 mM + ácido ferúlico 1 mM, por 48 horas	44
Tabela 8	Biomassa fresca (g plântula ⁻¹) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, submetidas ou não ao tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM, ou glifosato 0,5 mM + ácido ferúlico 1 mM por 48 horas	45
Tabela 9	Biomassa seca (g plântula ⁻¹) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, submetidas ou não ao tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM, ou glifosato 0,5 mM + ácido ferúlico 1 mM por 48 horas	46
Tabela 10	Teor de lignina (mg LTGA g raiz ⁻¹) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, submetidas ou não ao tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM, ou glifosato 0,5 mM + ácido ferúlico 1 mM por 48 horas	47

Tabela 11	Teor de fenóis das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, submetidas ou não ao tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM, ou glifosato 0,5 mM + ácido ferúlico 1 mM por 48 horas	48
Tabela 1A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação de lignina do tegumento das sementes das variedades CD-201 e CD-214RR	58
Tabela 2A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do teor de fenóis totais do tegumento das sementes das variedades CD-201 e CD-214RR	58
Tabela 3A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do crescimento das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em quatro tempos de incubação, com ou sem ácido ferúlico 1 mM	59
Tabela 4A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação da biomassa fresca das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em quatro tempos de incubação, com ou sem ácido ferúlico 1 mM	60
Tabela 5A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação da biomassa seca das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em quatro tempos de incubação, com ou sem ácido ferúlico 1 mM	61
Tabela 6A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do teor de lignina das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em quatro tempos de incubação, com ou sem ácido ferúlico 1 mM	62
Tabela 7A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do crescimento das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em 48 horas de incubação em solução nutritiva, com ou sem tratamento com glifosato, ácido ferúlico ou ácido ferúlico simultaneamente com glifosato	63
Tabela 8A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação da biomassa fresca das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em 48 horas de incubação em solução nutritiva, com ou sem tratamento com glifosato, ácido ferúlico ou ácido ferúlico simultaneamente com glifosato	63

Tabela 9A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação da biomassa seca das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em 48 horas de incubação em solução nutritiva, com ou sem tratamento com glifosato, ácido ferúlico ou ácido ferúlico simultaneamente com glifosato	64
Tabela 10A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do teor de lignina das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em 48 horas de incubação em solução nutritiva, com ou sem tratamento com glifosato, ácido ferúlico ou ácido ferúlico simultaneamente com glifosato	64
Tabela 11A	Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do teor de fenóis totais das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em 48 horas de incubação em solução nutritiva, com ou sem tratamento com glifosato, ácido ferúlico ou ácido ferúlico simultaneamente com glifosato	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Comparação entre planta convencional e tolerante ao glifosato, quanto à conformação e atividade da EPSP sintase e síntese de aminoácidos, na presença ou ausência do herbicida glifosato (BUCHANAN et al., 2000)	6
Figura 2	Diferenciação entre cultivares de soja não-GM e GM por meio de padrões eletroforéticos, com pré-embebição das sementes: (A) em substrato umedecido e (B) em substrato umedecido em solução de herbicida glifosato 0,6% (MENEZES et al., 2004)	12
Figura 3	Diferenciação entre cultivares de soja não-GM e GM por meio do método colorimétrico, com pré-embebição das sementes: (A) em substrato umedecido e (B) em substrato umedecido em solução de herbicida glifosato 0,6% (MENEZES et al., 2004)	13
Figura 4	Visão simplificada das principais vias de biossíntese de compostos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário (TAIZ; ZEIGER, 2004)	15
Figura 5	Derivados do ácido chiquímico - Via de síntese do ácido ferúlico (TAIZ; ZEIGER, 2004)	16
Figura 6	Via dos fenilpropenóides (BUCHANAN et al., 2000)	17
Figura 7	Sistemas de incubação das plântulas de soja em solução nutritiva	26
Figura 8	Crescimento médio das raízes da variedade CD-201, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva	35
Figura 9	Crescimento médio das raízes da variedade CD-214RR, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva	35
Figura 10	Médias da biomassa fresca das raízes (mg plântula ⁻¹) da variedade CD-201, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva	37

Figura 11	Médias da biomassa fresca das raízes (mg plântula ⁻¹) da variedade CD-214RR, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva	37
Figura 12	Médias da biomassa seca das raízes (mg plântula ⁻¹) da variedade CD-201, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva	39
Figura 13	Médias da biomassa seca das raízes (mg plântula ⁻¹) da variedade CD-214RR, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva	39
Figura 14	Médias do teor de lignina das raízes (mg LTGA g raiz ⁻¹) da variedade CD-201, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva	42
Figura 15	Médias do teor de lignina das raízes (mg LTGA g raiz ⁻¹) da variedade CD-214RR, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva	42

RESUMO

SUZUKI, Leticia Sayuri. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2006. **Crescimento, teores de lignina e fenóis totais em plântulas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) convencional e transgênica sob influência do ácido ferúlico e do glifosato.** Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho. Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Lúcio Ferrarese e Prof. Dr. Alessandro de Lucca e Braccini.

A soja RR (Roundup Resistant) possui uma variante da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase). Esta enzima atua na via do chiquimato e gera aminoácidos aromáticos essenciais, como a fenilalanina, que por sua vez são utilizados na síntese dos precursores da lignina. Na soja convencional, o glifosato obstrui a via do ácido chiquímico, pela inibição da EPSP sintase. Já na soja transgênica, o glifosato não consegue bloquear a atividade da EPSP sintase, por isso ela é resistente a esse herbicida. O aleloquímico ácido ferúlico, de ampla distribuição na natureza, reduz o crescimento das raízes e aumenta a produção de lignina na soja. Neste contexto, o presente trabalho teve como meta verificar se a soja transgênica apresenta diferenças no crescimento, teor de lignina e fenóis totais em comparação com a soja convencional, após o tratamento com ácido ferúlico. Também foram realizados tratamentos com o glifosato e com o ácido ferúlico juntamente com glifosato para analisar as mesmas variáveis, já que este herbicida interfere na síntese de aminoácidos aromáticos e lignina, com o objetivo de se verificar como as duas cultivares respondem aos tratamentos e se as técnicas utilizadas são apropriadas para diferenciar material transgênico de convencional. Sementes das cultivares CD-214RR e sua parental CD-201 foram germinadas a 25°C, e 25 plântulas uniformes, que constituíam uma repetição, tiveram suas raízes medidas e foram (as plântulas é que foram incubadas, não as raízes) incubadas em solução nutritiva, pH 6,0 contendo ou não ácido ferúlico 1 mM. Após o período de incubação (24 a 96 horas, fotoperíodo de 12 horas, 25°C, 280 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o comprimento das raízes, as biomassas frescas e secas, os teores de lignina e de fenóis totais foram determinados. Foram realizadas também dosagens de lignina e de fenóis totais

do tegumento das sementes das duas cultivares. Os resultados mostraram que o crescimento e as biomassas, fresca e seca, diminuíram enquanto os teores de lignina e de fenóis totais das raízes aumentaram significativamente com o decorrer do tempo e após o tratamento com ácido ferúlico. Não ocorreram diferenças significativas entre as cultivares convencional e transgênica após tratamento com ácido ferúlico. Isto significa que, para as cultivares testadas, a resistência ao herbicida glifosato, na soja RR, não modificou a resposta a esse aleloquímico sobre a síntese de lignina. O tratamento com glifosato diminuiu significativamente o crescimento, as biomassas frescas e secas e o teor de lignina das raízes da cultivar convencional, e a técnica de dosagem de lignina permitiu a diferenciação de soja convencional e transgênica, dentro desse tratamento. Em relação ao teor de fenóis totais do tegumento das sementes e das raízes que não receberam nenhum tratamento, houve diferença significativa entre as cultivares, sendo que a cultivar transgênica apresentou as maiores médias. Tais resultados indicam que a técnica de determinação de fenóis totais pode vir a ser opção alternativa para diferenciar soja convencional da transgênica.

Palavras-chave: ácido ferúlico, fenóis totais, metabolismo secundário, lignina, soja transgênica

ABSTRACT

SUZUKI, Letícia Sayuri. Maringá State University, February, 2006. **Growing, lignin and total phenols contents of conventional and Roundup Resistant soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under influence of ferulic acid and of the glyphosate.** Advicer: Osvaldo Ferrarese-Filho. Co-advicers: Maria de Lourdes Lúcio Ferrarese and Alessandro de Lucca e Braccini.

Roundup[®] Resistant (RR) soybean has a modified DNA that encodes a different form of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase) enzyme. This enzyme acts on shikimic acid pathway, which generates essential aromatic amino acids as phenylalanine. These amino acids are used as precursor of lignin synthesis. In conventional soybean, glyphosate blocks shikimic acid pathway, through EPSP synthase inhibition. In transgenic soybean, glyphosate is not able to block EPSP synthase activity, so it is resistant to this herbicide. Ferulic acid, an allelochemical commonly found in fields, is known for its effects on roots growth reduction and lignin biosynthesis increase of soybean. Thus, the present work had as objective to evaluate whether transgenic soybean show differences on growth, lignin and total phenolics (PhAs) compared to conventional soybean, after treatment with ferulic acid. Treatments with glyphosate and with ferulic acid associated with glyphosate were also made to evaluate the same aspects on soybean seedlings, as this herbicide interfere on aromatic amino acids and lignin synthesis, with the objective to verify how both cultivars are influenced by treatments and to evaluate whether the used techniques are reliable to differentiate transgenic from conventional material. Seeds of CD-214RR cultivar and its parental CD-201 were germinated on dark at 25°C and 25 seedlings, which constituted one replication, had their roots measured. The seedlings were then incubated in nutrient solution, pH 6.0, containing or not ferulic acid 1 mM, glyphosate 0.5 mM or ferulic acid 1 mM plus glyphosate 0.5 mM. After incubation (24 to 96 hours, 12 hours photoperiod, 25°C, 280 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), root growth, fresh and dry biomass and levels of lignin and PhAs were determined. Lignin and PhAs measurements were also done on seed coats.

Results showed a reduction of growth and fresh and dry biomasses, while lignin and PhAs content increased with ferulic acid treatment against the incubation time. No significant differences were observed between transgenic and conventional soybean after treatment with ferulic acid, which means that, for the cultivars tested, resistance to glyphosate on RR soybean did not modify the effects of this allelochemical on lignin synthesis. Glyphosate treatment reduced growth, fresh and dry biomasses and lignin content of conventional soybean. The lignin determination technique used in this work was able to differentiate conventional and transgenic soybean under treatment with herbicide. Significant differences between PhAs level of seeds coat and non-treated roots were observed between conventional and transgenic soybean, the last one having the greater values, which means that PhAs measuring technique used in this work may be employed to differentiate conventional and transgenic soybean.

Keywords: ferulic acid, secondary metabolism, lignin, total phenolics, transgenic soybean

1 INTRODUÇÃO

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina] é um herbicida pós-emergente de amplo espectro que inibe o crescimento de plantas daninhas e de espécies cultivadas. Ele interfere na biossíntese de aminoácidos aromáticos por meio da inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) sintase. A soja RR (resistente ao Roundup[®]) é caracterizada pela incorporação do gene CP4-EPSPS, clonado de *Agrobacterium sp*, linhagem CP4, em seu genoma (PADGETTE et al., 1995; FRANZ et al., 1997). A soja transgênica codifica uma variante da EPSP sintase que possui baixa afinidade pelo glifosato, conferindo à planta resistência a este herbicida, isto é, a atividade da enzima se mantém independente da presença ou ausência do glifosato (PADGETTE et al., 1995; HARRISON et al., 1996; SHAH et al, 1986).

A EPSP sintase atua na via do ácido chiquímico, responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, como a fenilalanina e a tirosina. Estes aminoácidos, além de constituírem proteínas importantes para o desenvolvimento da planta, participam da via dos fenilpropenóides, principal caminho para a síntese de compostos fenólicos, dentre eles os monolignóis, precursores da lignina. Assim, ao obstruir a via do ácido chiquímico, pela inibição da EPSP sintase, o glifosato pode afetar não só a produção de proteínas de soja convencional, mas também a via metabólica geradora de lignina. Já, para o caso da soja transgênica não existem informações neste contexto.

O ácido ferúlico é um intermediário na síntese dos monolignóis que constituem a lignina presente na parede celular secundária. Além disso, possui função importante na parede celular primária onde é esterificado a pectinas e, por meio de dimerizações, efetua ligações cruzadas entre polissacarídeos, podendo também ligar estes polímeros à lignina. Estas ligações enrijecem a parede tornando-a menos digerível para patógenos e herbívoros, além de limitar o processo de alongamento celular. Tanto a polimerização dos monolignóis quanto as dimerizações do ácido ferúlico são atribuídas às peroxidases (ISHII, 1997). Produzido pela maior parte das monocotiledôneas

(SMITH; HARRIS, 2000), este fenilpropenóide é parcialmente responsável pelo efeito da resteva de gramíneas que inibe o crescimento de outras plantas, sobretudo dicotiledôneas (RODRIGUES et al., 1999). De reconhecida característica alelopática, o ácido ferúlico interfere em muitos processos vitais das plantas, porém sua atuação não é específica. As funções prejudicadas, com maior frequência, são a utilização de água e assimilação de nutrientes (LYU; BLUM, 1990; BERGMARK et al., 1992; BOOKER et al., 1992), o crescimento de raízes e expansão de folhas (BLUM; DALTON, 1985), a fotossíntese e a síntese de proteínas (MERSIE; SINGH, 1993), a respiração celular (DEMOS et al., 1975), a permeabilidade da membrana celular e atividades enzimáticas (BAZIRAMAKENGA et al., 1995; POLITYCKA, 1996, 1997, 1998; HERRIG et al., 2002).

Recentemente, Santos et al. (2004) relataram que plântulas de soja (*Glycine max* L.) submetidas ao ácido ferúlico tiveram os comprimentos das raízes e as biomassas frescas e secas reduzidas enquanto que as atividades das peroxidases, solúvel e ligada, e da fenilalanina amônia liase, enzimas associadas à via de fenilpropenóides, foram estimuladas com subseqüentes aumentos nos teores de lignina. Para esses autores, os resultados denotam uma relação entre a redução do desenvolvimento das plântulas, provocado pelo ácido ferúlico, e a ativação de enzimas e produção de lignina, sugerindo que a atuação no processo de lignificação seria um dos seus prováveis modos de ação.

Como o glifosato é um herbicida que interfere na via de síntese de aminoácidos aromáticos e, por sua vez, na síntese de lignina, as determinações deste polímero bem como de fenóis totais, nas raízes das plântulas convencionais e transgênicas, poderão estabelecer diferenças possivelmente existentes entre as duas cultivares. Essas determinações poderão, eventualmente, ser aplicadas ao tegumento das sementes, o que significa que, em havendo diferenças significativas entre o material transgênico e convencional, as técnicas poderão ser ferramentas alternativas úteis na discriminação das cultivares.

Pelo fato do ácido ferúlico ser um aleloquímico que interfere na via dos fenilpropenóides, e a soja transgênica possuir modificação genética inerente a essa via, a questão central deste trabalho foi avaliar se alteração da EPSP

sintase se resume apenas à sua resistência ao glifosato ou se ela também interfere na via da qual faz parte, na presença ou ausência do herbicida. Ainda que os efeitos do ácido ferúlico no crescimento e na via dos fenilpropanóides sejam conhecidos nas plântulas de soja, o enfoque deste trabalho poderá apontar diferenças existentes entre a soja convencional e transgênica, dentro dos fatores sobre os quais o aleloquímico interfere. Nesta linha de raciocínio, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento, a lignificação e o teor de fenóis totais das cultivares CD-201, convencional parental, e CD-214RR, transgênica após tratamento ou não com ácido ferúlico ou glifosato.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Efeitos bioquímicos do glifosato nas plantas

O glifosato é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas (N-fosfometil glicina), classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Apresenta largo espectro de ação, o que possibilita o controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas.

O glifosato é absorvido basicamente pela região clorofilada das plantas, e translocado preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos. Ele atua como um potente inibidor da atividade da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) sintase, que é uma enzima catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (GALLI; MONTEZUMA, 2005; PADGETTE et al., 1995). A enzima catalisa a reação entre o chiquimato-3-fosfato e o fosfoenolpiruvato para formar o 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato. Portanto, sua inibição impede a planta de sintetizar os aminoácidos aromáticos, essenciais para a síntese protéica e de alguns metabólitos secundários. A EPSP sintase pode ser encontrada em todas as plantas, bactérias e fungos, mas não em animais. Os animais não podem sintetizar seus próprios aminoácidos aromáticos, mas devem recebê-los por meio da alimentação, pela ingestão de vegetais, fungos ou outros animais. Nas plantas, a EPSP sintase é encontrada nos cloroplastos ou plastídeos (PADGETTE et al., 1995).

Muitas plantas liberam, pelas raízes e folhas, grande variedade de metabólitos secundários, como os ácidos fenólicos, principalmente caféico e ferúlico, que podem reduzir o crescimento de várias outras plantas e inibir a germinação. Nesse aspecto, a ação do glifosato também é efetiva, pois como inibe a atividade da EPSP sintase, inibe também a rota do ácido chiquímico, que é a via de formação dos ácidos fenólicos. Não ocorrendo liberação destes compostos, no solo, provavelmente, não ocorrerá interferência no desenvolvimento de plantas cultivadas.

Um dos principais obstáculos para o uso do glifosato era a sua falta de seletividade. Nesse sentido, as técnicas de engenharia genética contornaram esse problema por meio do desenvolvimento de variedades resistentes ao glifosato, possibilitando seu uso mesmo após a emergência da espécie cultivada (PADGETTE et al., 1995; GALLI; MONTEZUMA, 2005).

2.2. Desenvolvimento da soja transgênica

A engenharia genética tem equipado melhoristas e agricultores com ferramentas até pouco tempo atrás indisponíveis decorrente das limitações dos *pools* de genes acessíveis por meio do melhoramento genético convencional. O melhoramento genético de plantas é uma das áreas que mais tem sido beneficiada por estas novas técnicas. Além de facilitar a introdução pontual de genes de interesse em um determinado genótipo, a engenharia genética quebra a barreira entre as espécies. Assim, uma vez que os geneticistas não precisam mais se restringir a barreiras intra-específicas, os genes agora podem ser acessados virtualmente de qualquer organismo vivo, modificado para a obtenção de expressões ótimas em tecidos e partes de plantas específicas, e inseridos no genoma da maioria das espécies cultivadas. Na soja, uma das primeiras aplicações práticas da engenharia genética foi o desenvolvimento da resistência ao glifosato, que teve início na década de 80 (DELANNAY et al., 1995; PADGETTE et al., 1995; MARIN et al., 2000).

As pesquisas indicavam que a aquisição de altos níveis de tolerância ao glifosato pela planta dependia da expressão de uma EPSP sintase que fosse tolerante ao glifosato e que tivesse uma alta eficiência catalítica na presença do herbicida (Figura 1). Vários trabalhos foram conduzidos com a EPSP sintase “G101A” – em que a glicina é substituída por alanina na posição 101 – da petúnia e outras variantes, mas nenhuma delas, até então, havia sido identificada como sendo, ao mesmo tempo, altamente tolerante ao glifosato e com a mesma eficiência catalítica da EPSP sintase selvagem, isto é, com alta afinidade pelo fosfoenolpiruvato, seu substrato (PADGETTE et al., 1995).

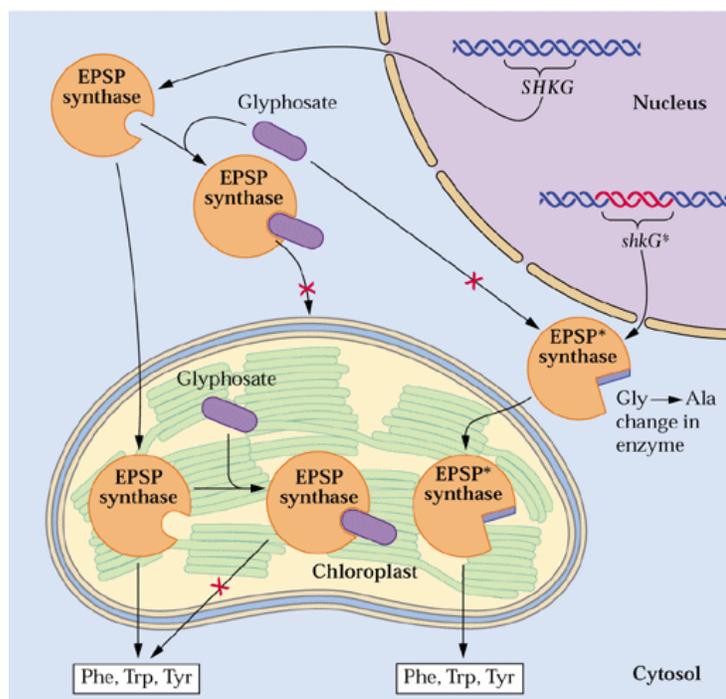


Figura 1 – Comparação entre planta convencional e tolerante ao glifosato, quanto à conformação e atividade da EPSP sintase e síntese de aminoácidos, na presença ou ausência do herbicida glifosato (BUCHANAN et al., 2000).

Segundo Padgett et al. (1995), a EPSP sintase de *Agrobacterium* sp, cepa CP4 (CP4 EPSPS), uma enzima de ocorrência natural nessa bactéria foi identificada dentre vários extratos celulares de diferentes microrganismos como tendo parâmetros cinéticos bastante favoráveis, em relação à tolerância ao glifosato e à afinidade com o fosfoenolpiruvato, apresentando uma constante de inibição aparente ($K_{i,ap}$) em relação à concentração de glifosato igual a 2,7 mM, e uma constante de inibição aparente ($K_{m,ap}$) em relação à concentração de fosfoenolpiruvato igual a 12 mM. O $K_{i,ap}$ representa a capacidade da EPSP sintase de se ligar e ser inibida pelo glifosato. Quanto maior o valor de K_i maior a tolerância da enzima ao glifosato. Já, o valor de $K_{m,ap}$ é uma medida da habilidade da enzima de se ligar ao seu substrato, o fosfoenolpiruvato. Quanto menor o valor de K_m , maior é a capacidade da enzima interagir com o substrato e catalisar a reação. Isto ocorre porque, quanto maior a eficiência catalítica de

uma enzima, menor a concentração de substrato que ela vai precisar para atuar em velocidade máxima (V_{max}).

Baseado nestes parâmetros cinéticos, o gene que codifica a CP4 EPSPS foi clonado de *Agrobacterium* sp, cepa CP4, expresso em *Escherichia coli* e então nas plantas de interesse, como a soja. Padgett et al. (1995) desenvolveram uma linhagem de soja Roundup Ready (RR, marca registrada da Monsanto Corporation para os genes que conferem tolerância ao glifosato) com este material genético, denominado 40-3-2, atualmente utilizado como fonte da característica de tolerância ao glifosato em vários programas de melhoramento, para o desenvolvimento de novas cultivares com o gene RR.

Delannay et al. (1995) avaliaram a produtividade da linhagem 40-3-2 e sua progênie em 17 locais em 1992, 23 locais em 1993 e 18 locais em 1994, em várias regiões dos Estados Unidos. Nesses locais, foi aplicado o glifosato comercial (360 g do equivalente ácido litro de glifosato⁻¹) em diversas doses, variando entre 430 e 1680 g do equivalente ácido ha⁻¹, desde o início do crescimento vegetativo até a fase de formação das vagens. Não foi constatada redução significativa na produtividade, comparando-se os tratamentos com glifosato e as testemunhas, em todos os locais. A tolerância ao herbicida pode ser subdividida em tolerância vegetativa, isto é, nenhuma injúria nas folhas ou redução no crescimento após o tratamento, e reprodutiva, isto é, pólen normal, fertilidade dos óvulos e formação de vagens. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram que a tolerância vegetativa é mais fácil de ser obtida que a tolerância reprodutiva. Algumas plantas exibiram esterilidade do pólen quando tratadas com glifosato pouco antes do início da floração, fase em que ocorre meiose das células reprodutivas, mesmo com excelente crescimento vegetativo. Estes casos, porém, foram isolados e não se repetiram em outros experimentos, e não afetam a produtividade. Foi observado também que o nível de tolerância foi estável de geração para geração. Os autores concluíram que, sendo um único gene dominante, o gene da tolerância ao glifosato poderia ser utilizado de maneira eficiente em programas de melhoramento para obtenção de novas cultivares tolerantes a esse herbicida.

Gazziero et al. (1999) testaram os efeitos da aplicação do glifosato em diferentes estádios de desenvolvimento da soja transgênica BR-16RR. Aplicações com doses únicas de 900 a 1800 g ha⁻¹, seqüenciais de 540 + 900

g ha⁻¹ e 900 + 900 g ha⁻¹ do equivalente ácido do herbicida, com pulverizações a cada 15 dias, iniciando-se aos 15 dias de emergência e procedendo até 105 dias foram efetuadas. Os resultados indicaram que não ocorreram danos aparentes, por meio da avaliação visual de fitotoxicidade; diferenças no rendimento de grãos também não foram estatisticamente significativas.

2.3. Métodos de identificação de material transgênico

Alguns métodos têm sido utilizados para a identificação e proteção de cultivares de soja, tanto as convencionais como as modificadas geneticamente, assim como para a certificação da pureza genética dessas sementes. Estas técnicas são importantes tanto para o mercado de sementes quanto para os mercados cujos consumidores exigem rotulagem de material transgênico ou desejem produtos atestados como não-transgênicos. Os grandes importadores de soja, como a União Européia, China, Japão e Coréia, estabeleceram um acordo no sentido da satisfação da demanda de seus consumidores: a introdução da obrigatoriedade de rotulagem em produtos que contenham níveis de organismos geneticamente modificados (OGM) acima dos limites permitidos, sem com isso restringir as importações do Complexo Soja. No Brasil, a rotulagem é obrigatória em produtos que apresentam OGM em nível superior a 1%, sendo que essa fiscalização fica a cargo do Ministério da Agricultura na semeadura, transporte e armazenamento, e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) fiscaliza a indústria (VON PINHO, 2002; MIRANDA et al., 2005).

2.3.1 Bioensaios

Os bioensaios são métodos que avaliam a tolerância ao glifosato por meio de testes de germinação, de forma similar ao descrito nas Regras para a Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Estes testes detectam a presença das sementes tolerantes ao herbicida pela comparação das características das plântulas provenientes de várias sementes de um mês mo lote.

Cunha et al. (2005) e Miranda et al. (2005) testaram vários bioensaios para detecção de sementes de soja transgênica: a) pré-embebição em papel-toalha, onde as sementes são pré-embebidas em uma solução com 0,6% do equivalente ácido do glifosato, por 16 horas, a 25°C, e depois transferidas para rolos de papel umedecido com água destilada, sendo a avaliação das plântulas realizada no quinto dia; b) semeadura direta em papel de germinação umedecido com solução 0,03% do equivalente ácido do glifosato e avaliação das plântulas no quinto dia; c) imersão das sementes em copos plásticos contendo solução 0,12% do equivalente ácido do glifosato por 1 hora a 30°C, com posterior teste de germinação a 30°C e avaliação no quinto dia e, d) pulverização da parte aérea das plântulas no quinto dia do teste de germinação, sendo a avaliação feita três dias após esse processo. Duzentas sementes para cada repetição foram utilizadas, subdivididas em oito amostras de 25 sementes cada. As plântulas tolerantes ao herbicida se desenvolveram normalmente e as intolerantes apresentaram anomalias ou morreram. Segundo os autores, o bioensaio mais indicado é o da pré-embebição das sementes porque não afetou a percentagem de germinação e permitiu clara diferenciação nas características de crescimento das plântulas. Este bioensaio também foi o mais recomendado para a quantificação das sementes transgênicas, apresentando exatidão na quantificação da presença de até 3% de sementes de soja GM em amostras convencionais, sendo sua precisão condicionada ao percentual de mistura presente na amostra.

O método de imersão das sementes também permitiu a distinção da soja transgênica, mas reduziu drasticamente a percentagem de germinação. O método da pulverização não se mostrou eficiente na distinção entre os lotes transgênicos e convencionais, além de ser mais demorado. Igualmente, o método do substrato umedecido não apresentou resultados satisfatórios, pelo fato das sementes ficarem todo o período do teste em contato com a solução do herbicida. Como desvantagem dos bioensaios deve ser considerado o período gasto para a condução dos mesmos, que é de cinco a oito dias. Em contrapartida, são testes simples e baratos, de fácil padronização, podendo ser realizado ainda na presença de outros herbicidas, e têm sido utilizados extensivamente nas empresas produtoras de sementes (BRACCINI et al., 2004; VON PINHO, 2002; CUNHA et al., 2005; MIRANDA et al., 2005).

2.3.2 ELISA

Outros testes baseados na detecção da proteína codificada pelo gene introduzido nas plantas podem ser utilizados para detectar material transgênico. Sabe-se que os genes que são introduzidos durante a transformação se expressam produzindo proteínas. O teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosoybant Assay*) tem sido utilizado para detectar a proteína CP4 EPSPS em sementes de soja transgênica. Nesse teste, a proteína CP4 EPSPS é reconhecida por um anticorpo. São usados anticorpos para identificar uma proteína-alvo nas sementes ou nos tecidos da planta, ou seja, é testado para a presença da proteína específica que o DNA modificado geneticamente produz na planta. Quando a proteína está presente, a reação química ocorre, criando uma mudança de cor na solução-teste. Quando a proteína não está presente, a cor da solução-teste permanece inalterada. Esse teste é basicamente qualitativo, ou seja, indica a presença ou ausência de sementes de soja com o gene de tolerância ao glifosato. Alguma indicação da quantidade é obtida pela intensidade da cor da solução no teste positivo (VON PINHO, 2002).

Outras técnicas envolvendo proteínas específicas são os testes denominados de *dipstick*, também conhecidos como testes da tira, os quais permitem uma avaliação rápida da presença ou ausência de OGM. Nesse teste é utilizado um anticorpo duplo no formato de sanduíche. Anticorpos específicos para a proteína CP4 EPSPS são acoplados a um reagente colorido e incorporados em uma tira. Quando uma pequena quantidade do extrato do tecido da planta que contenha a proteína CP4 EPSPS é colocada em contato com a tira, ocorre a formação de duas linhas coloridas indicando a presença de OGM. De um modo geral, o teste ELISA exige pouco treinamento e não necessita de equipamento sofisticado. No entanto, testes múltiplos são requeridos para traços múltiplos, ou seja, quando mais de um gene é incorporado na planta (VON PINHO, 2002). Cunha et al. (2005) testaram este método e o consideraram como sendo prático e eficiente, mas o custo dos *kits* é bem superior ao dos bioensaios.

2.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Uma outra técnica mais sofisticada para a detecção de cultivares transgênicas em sementes de soja é chamada de PCR. Essa técnica pode ser usada para detectar o material genético específico o qual foi introduzido no DNA da planta. Nesse caso, um par de 'primers' é utilizado para amplificar um segmento específico do DNA, gerando milhões de cópias. Os fragmentos amplificados são separados de acordo com o tamanho em um gel de agarose. A presença de fragmento indica que o gene está presente no organismo do qual o DNA foi extraído, e a ausência indica que o gene específico não está presente no organismo. Existem diferentes 'primers' para a amplificação do DNA presente em muitos OGM. Dessa forma, a detecção desses elementos pode servir como diagnóstico de uma grande quantidade de plantas transgênicas. Essa técnica pode ser tanto qualitativa como quantitativa. É mais sensível que o método Elisa e pode detectar 0,1% de contaminação em uma amostra. Tem a vantagem ainda de ser facilmente adaptado para o DNA de diferentes genes modificados como o milho Bt, milho RR ou milho com alto teor de lisina. Vale ressaltar, no entanto, que à medida que o número de traços de OGM aumenta, esta técnica, que já é cara, torna-se ainda mais dispendiosa, uma vez que cada gene diferente introduzido requer um teste separado (VON PINHO, 2002).

Segundo Cunha et al. (2005), a análise por PCR é bastante sensível e confiável, mas requer equipamentos sofisticados e reagentes de alto custo. O uso de adequada combinação de 'primers' e adequado controle da performance do experimento é imprescindível. O 'primer' 35S foi considerado o mais expressivo e a seqüência específica para o promotor 35S foi a mais encontrada. É uma técnica de difícil padronização, mas importante ferramenta no caso de um re-teste em caso de dúvidas quanto à detecção de OGM por meio de outras metodologias.

2.3.4 Testes bioquímicos

Menezes et al. (2004) utilizaram testes bioquímicos com base na atividade de peroxidases, com o objetivo de detectar soja RR. As sementes

utilizadas foram das cultivares CD-201 e CD-214RR, embebidas por 16 horas em solução de glifosato e depois submetidas ao teste de germinação por sete dias. Após esse período, foi realizada a extração e a determinação da atividade da peroxidase pela avaliação de eletroforegramas e de reação colorimétrica.

A determinação da atividade enzimática por meio de eletroforese foi realizada pela extração de proteínas totais do tecido das amostras, centrifugação e aplicação do sobrenadante em gel de poliacrilamida, posteriormente submetido à eletroforese, sob refrigeração. Os géis obtidos foram mantidos por um minuto em solução reveladora específica para o correspondente sistema enzimático. O tecido da planta que apresentou maior atividade enzimática foi a raiz. No tratamento de pré-embebição, em substrato umedecido com água (testemunha), foi constatada atividade da enzima de forma similar para as duas cultivares. Para o tratamento com herbicida, observou-se diferença nos padrões eletroforéticos entre as cultivares analisadas, sendo que a transgênica apresentou maior intensidade de bandas, o que demonstra aumento da atividade da peroxidase (Figura 2).

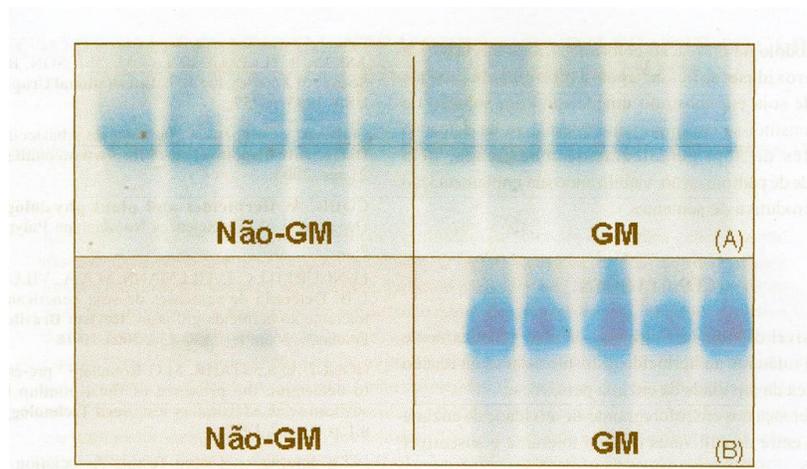


Figura 2 – Diferenciação entre cultivares de soja não-GM e GM por meio de padrões eletroforéticos, com pré-embebição das sementes: (A) em substrato umedecido e (B) em substrato umedecido em solução de herbicida glifosato 0,6% (MENEZES et al., 2004).

A determinação da atividade enzimática por meio de reação colorimétrica foi conduzida com base no teste da peroxidase descrito nas

“Regras para Análise de Sementes – RAS” (BRASIL, 1992). Foi determinada a atividade da peroxidase no tegumento e nas plântulas, após a extração das proteínas totais, reação com o guaiacol e água oxigenada. Por titulação, foi estabelecida a quantidade apropriada para determinar a atividade da enzima. As duas cultivares apresentaram resultados positivos para a atividade da peroxidase, nos tegumentos. Comparando as duas cultivares, após tratamento de pré-embebição somente em água, foi possível observar a ausência de coloração nas mesmas, o que corresponde à baixa atividade da peroxidase (Figura 3). Os resultados obtidos com o tratamento da pré-embebição, em substrato umedecido com solução de glifosato, mostraram similaridade com os padrões usados nos eletroforegramas, tornando possível a diferenciação visual das amostras por meio da coloração marrom avermelhada presente nas amostras provenientes da cultivar transgênica. A coloração da solução evidencia a elevada atividade da peroxidase na cultivar transgênica, em consequência do estresse causado pelo herbicida, associado à formação de plântulas normais.

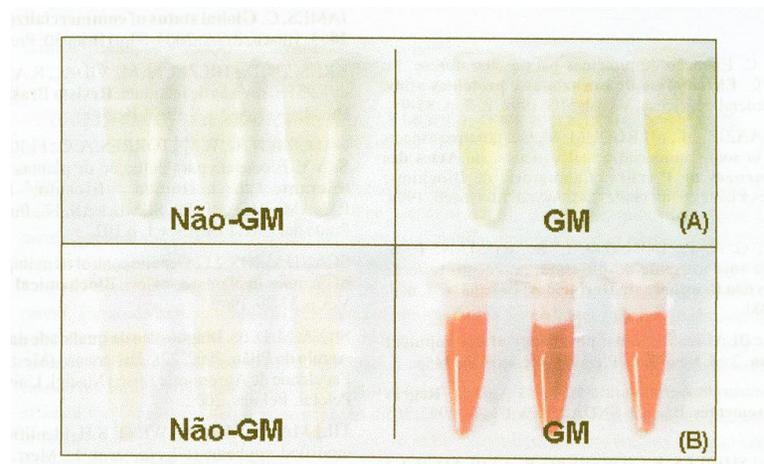


Figura 3 – Diferenciação entre cultivares de soja não-GM e GM por meio do método colorimétrico, com pré-embebição das sementes: (A) em substrato umedecido e (B) em substrato umedecido em solução de herbicida glifosato 0,6% (MENEZES et al., 2004).

2.4 Compostos fenólicos – visão geral

As plantas produzem grande variedade de compostos orgânicos que, em geral, não apresentam ação direta em alguns dos seus processos vitais como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Estes compostos são denominados de metabólitos secundários ou produtos naturais que podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos, segundo Taiz e Zeiger (2004): terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Figura 4).

Primordialmente, as plantas se originaram em um ambiente aquático. O sucesso de sua adaptação ao ambiente terrestre é grandemente atribuído aos compostos fenólicos produzidos por elas. Embora a maioria dessas substâncias tenha papel estrutural, há uma grande quantidade de compostos não-estruturais que assumem funções variadas como defesa das plantas; determinação de certas características da madeira, como sua durabilidade e aroma; estabelecimento da coloração das flores e contribuindo substancialmente para a formação de aromas e sabores. Essas e outras funções desempenhadas pelos compostos fenólicos são essenciais para a sobrevivência das plantas. Contando com cerca de 40% do carbono orgânico circulante na biosfera, esses compostos são derivados primariamente da via do ácido chiquímico e a via dos fenilpropenóides, a qual o ácido ferúlico faz parte, e outras vias bioquímicas ligadas a ela como a que leva a formação dos taninos (BUCHANAN et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os compostos fenólicos das plantas são geralmente caracterizados como metabólitos aromáticos que possuem uma ou mais hidroxilas ligadas ao anel aromático, formando um grupo fenol. Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos: alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há, ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis (BUCHANAN et al., 2000).

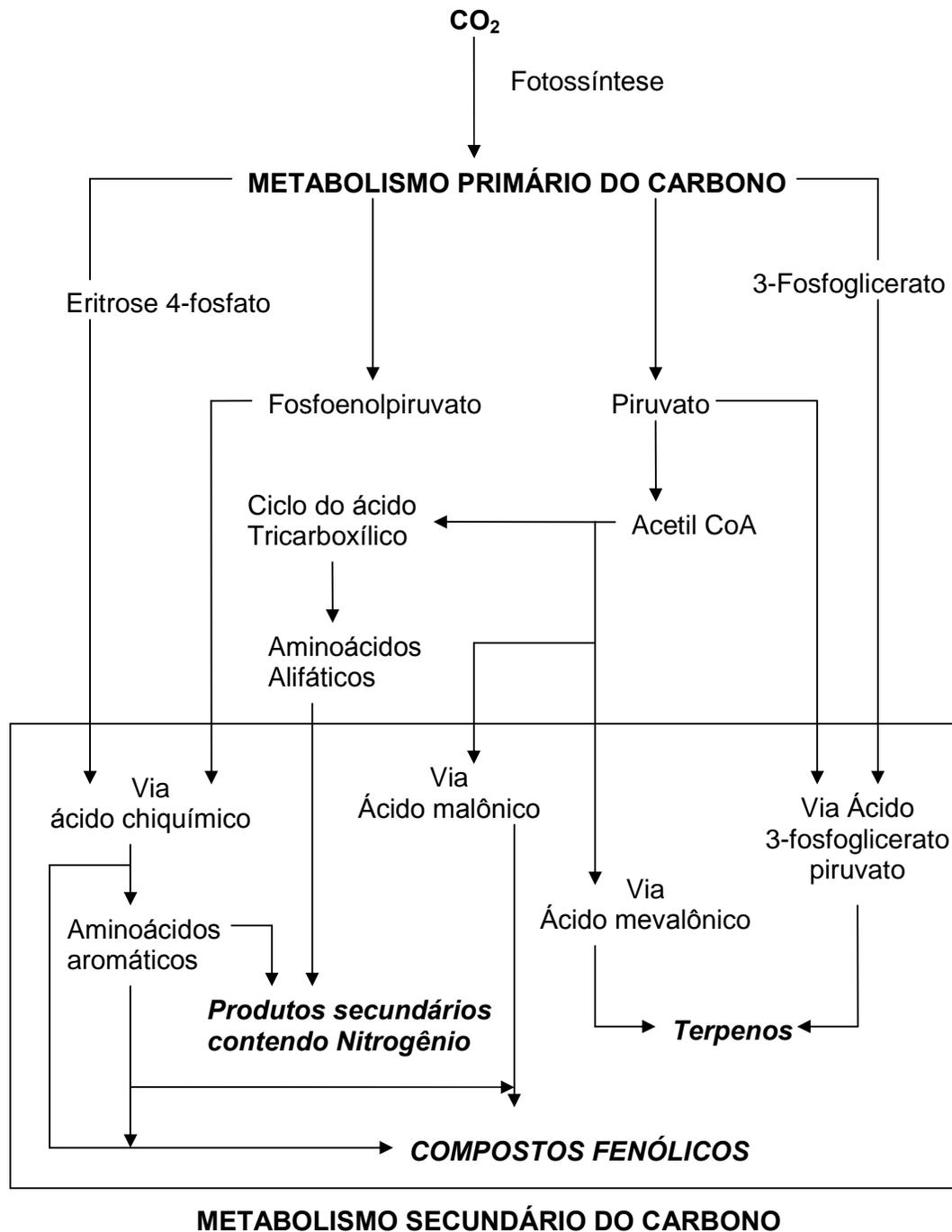


Figura 4 – Visão simplificada das principais vias de biossíntese de compostos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos, derivados da glicólise e da rota da pentose fosfato, em aminoácidos aromáticos como a fenilalanina e a tirosina. O herbicida glifosato bloqueia uma reação

dessa via que é a que converte o ácido 5-fosfochiquímico em ácido 3-enolpiruvil-5-fosfochiquímico (Figura 5). A rota do ácido chiquímico está presente em plantas, fungos e bactérias, mas não é encontrada em animais que, não podendo sintetizar os aminoácidos aromáticos, precisam obtê-los pela alimentação (BUCHANAN et al., 2000).

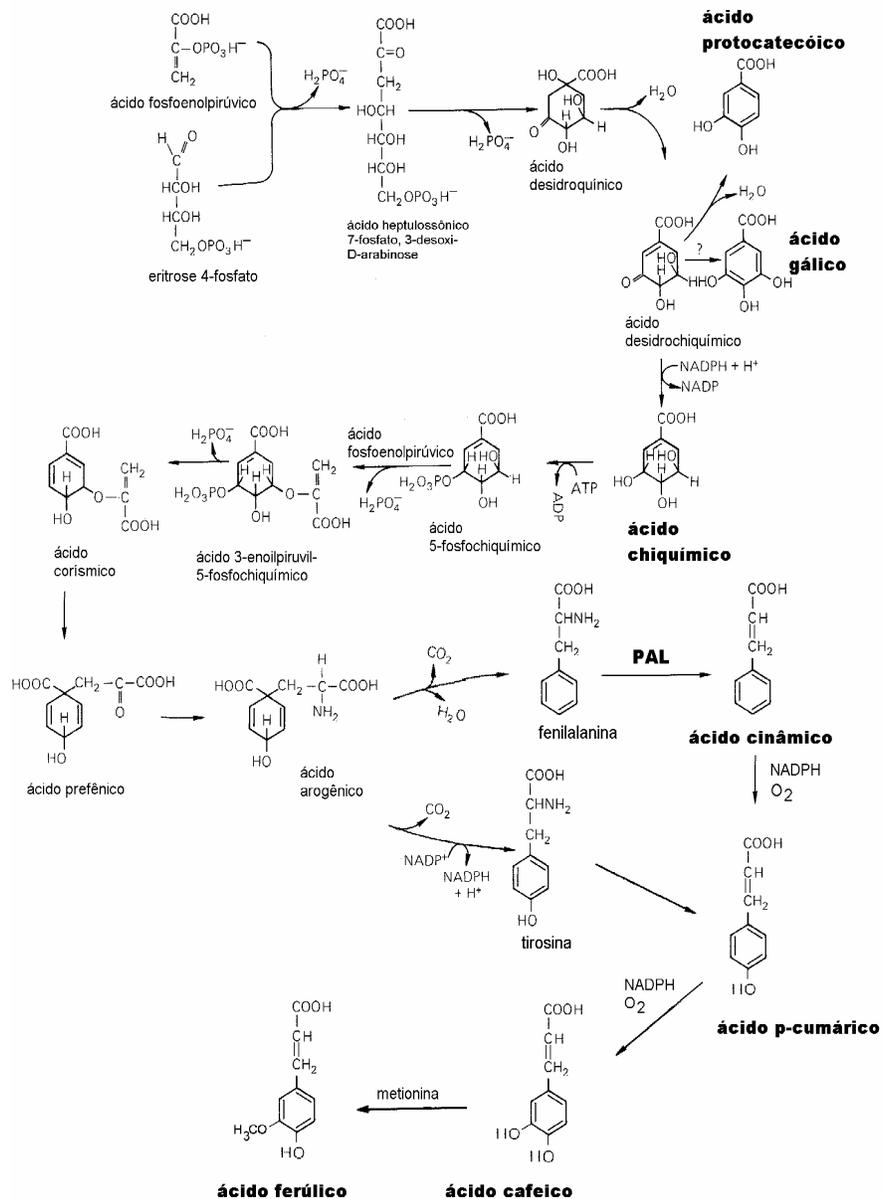


Figura 5 – Derivados do ácido chiquímico - Via de síntese do ácido ferúlico (TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.4.1 Distribuição dos compostos fenólicos no solo

Embora existam inúmeros compostos fenólicos identificados pouco se conhece a respeito do mecanismo celular envolvido na sua liberação pelos tecidos vivos bem como os fatores, em especial os ambientais, que influenciam o tipo e a quantidade liberada. Porém, é certo que os compostos fenólicos podem ser identificados tanto nas plantas como no solo (EINHELLIG, 1995; FERRARESE, 2000).

Os compostos fenólicos são comumente encontrados em resteva de gramíneas como o trigo e a aveia, em situações de semeadura direta (VOLL, 1993). De acordo com Whitehead (1964) e Kuiters (1990), os compostos fenólicos estão presentes em concentrações que variam de 0,01 a 0,1 mM, podendo, em algumas circunstâncias, alcançar concentrações superiores a 1,0 mM. Guenzi e Mccalla (1966) observaram que resíduos da cultura de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) liberaram 100 kg/ha de ácido *p*-cumárico ao solo. Em áreas onde foi plantado cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), detectaram valores próximos de 0,6 e 3 μ moles por grama de solo contendo ácido ferúlico e *p*-cumárico, respectivamente. Lodhi (1976) relatou o fato de terem sido detectadas, nas florestas do Missouri, nos Estados Unidos, quantidades dez vezes superiores às referidas por Whitehead (1964). O autor afirmou, ainda, que os ácidos caféico, *p*-cumárico, ferúlico e *p*-hidroxibenzóico são os mais persistentes aleloquímicos encontrados, e que outros derivados do ácido cinâmico atuam temporariamente como agentes alelopáticos.

2.5 Efeitos do ácido ferúlico nas plantas

Produzido pela maior parte das monocotiledôneas (SMITH; HARRIS, 2000), o ácido ferúlico é parcialmente responsável pelo efeito da resteva de gramíneas que inibe o crescimento de outras plantas, sobretudo dicotiledôneas (RODRIGUES et al., 1999). De reconhecida característica alelopática, o ácido ferúlico interfere em muitos processos vitais das plantas. Os efeitos mais conhecidos são a redução do crescimento das plantas e o aumento na síntese de lignina.

Os efeitos do ácido ferúlico no crescimento e no metabolismo de plântulas de pepino foram intensamente investigados. Ele é absorvido pelas raízes, translocado por meio da planta e usado como precursor na síntese de lignina. Fisiologicamente, o ácido ferúlico diminuiu a expansão da área foliar e a biomassa seca, inibiu a germinação e o crescimento da radícula e das raízes. Também influenciou a taxa de fotossíntese, absorção de nutrientes minerais e atividades de enzimas (HOLAPPA; BLUM, 1991). Efeitos semelhantes foram detectados em milho (DEVI; PRASAD, 1996), soja (BAZIRAMAKENGA et al., 1994; BAZIRAMAKENGA et al., 1997, HERRIG et al., 2002, SUZUKI et al., 2003, SANTOS et al., 2004) e várias outras espécies.

2.5.1 Efeitos na absorção de nutrientes minerais e na utilização da água

Vários pesquisadores têm relatado alterações no crescimento das raízes de diferentes plantas submetidas ao ácido ferúlico (DEMOS et al., 1975; VAUGHAN; ORD, 1990; EINHELLIG; ECKRICH, 1984; BLUM; REBBECK, 1989; PATTERSON, 1981; DEVI; PRASAD, 1996; SANTOS et al., 2004). Algumas das funções prejudicadas pela ação do ácido ferúlico se referem à utilização de água e assimilação de nutrientes (LYU; BLUM, 1990; BERGMARK et al., 1992; BOOKER et al., 1992). Por exemplo, Booker et al. (1992) avaliaram os efeitos do ácido ferúlico em plântulas de pepino, com base na hipótese de que a diminuição no crescimento, observada em plantas que recebem este tratamento seria, em parte, causada pela diminuição na absorção de minerais e água. Os resultados confirmaram que o ácido ferúlico diminui a absorção de íons, especialmente o nitrato (NO_3^-) e promove o efluxo de potássio das raízes.

Blum e Dalton (1985) relataram que plântulas de pepino tratadas com ácido ferúlico em solução nutritiva ocasionaram diminuição da expansão foliar, da área foliar e da biomassa seca. O tratamento com ácido ferúlico 1,0 mM, ou em maior concentração, resultou em folhas murchas, sendo que uma recuperação visível ocorreu dentro de 24 a 48 horas após eliminação do aleloquímico. Uma vez que as plântulas foram retiradas da solução com ácido ferúlico, a expansão foliar passou a ocorrer novamente, e a magnitude da recuperação dependeu da concentração e da frequência de aplicação do

composto, além da idade da plântula. Os autores concluíram que a redução na expansão foliar seria, em parte, resultado da diminuição na utilização de água das plântulas tratadas, este sim sendo o efeito primário do aleloquímico.

Holappa e Blum (1991) observaram que o aumento na concentração de ácido ferúlico, na solução nutritiva, inibiu o crescimento das folhas e a utilização da água em plântulas de tomate e pepino. Lyu e Blum (1990) relataram que plântulas de pepino submetidas ao tratamento com ácido ferúlico 0,5 mM, durante 24 horas, tiveram a absorção de fósforo, potássio e água reduzidos em 57, 75 e 29%, respectivamente, comparado com plântulas que não receberam o tratamento. Foi observado também que a taxa de transpiração (ml cm² de folha) reduziu linearmente, conforme aumentava a área de raízes expostas ao tratamento, e a redução na transpiração alcançou níveis de 11%, comparado com o controle.

2.5.2 Efeitos na fotossíntese e na síntese protéica

Alguns autores propuseram que os ácidos fenólicos afetam direta ou indiretamente a fotossíntese, a atividade de fitormônios e a síntese de proteínas (MERSIE; SINGH, 1993; BAZIRAMAKENGA et al., 1995).

Baziramakenga et al. (1994) constataram que o tratamento de plantas de soja com ácido benzóico e ácido cinâmico, do qual o ácido ferúlico é derivado, apresentaram sintomas de clorose, especialmente em concentrações maiores que 100 µM. Isso foi refletido nos teores de clorofila: a clorofila *a* foi mais afetada que a clorofila *b* sendo que, a 200 µM, o teor de clorofila *a* diminuiu 37% na presença de ácido benzóico, e 27% na presença de ácido cinâmico. Apenas o ácido benzóico, em concentrações superiores a 100 µM, reduziu o teor de clorofila *b*.

Baziramakenga et al. (1997) testaram os efeitos do ácido ferúlico e de outros ácidos fenólicos na absorção de fosfato e de metionina pelas raízes de soja e incorporação destes em ácidos nucléicos e proteínas, respectivamente. Tanto a absorção de fosfato quanto sua incorporação em ácidos nucléicos foram reduzidas sob ação de ácido ferúlico. O mesmo ocorreu com a absorção de metionina e sua incorporação em proteínas.

Mersie e Singh (1993) avaliaram os efeitos do ácido ferúlico e de outros ácidos fenólicos na fotossíntese e na síntese de proteínas em células isoladas das folhas de *Abutilon theophrasti*. Os compostos foram diluídos na suspensão celular e, após 60 minutos de tratamento, a taxa de fotossíntese foi reduzida em 37% nas células tratadas com ácido ferúlico 100 μM . A síntese de proteínas foi determinada por meio da medida da incorporação de leucina marcada com ^{14}C . Observou-se que o ácido ferúlico, na concentração de 1 μM , por 60 minutos, diminuiu a síntese protéica em aproximadamente 50%, sendo o aleloquímico que apresentou o maior efeito. Esses resultados também servem de embasamento para justificar a diminuição no crescimento, observada nas plantas que sofrem a ação do ácido ferúlico.

2.5.3 Efeitos na composição de carboidratos e de ácidos graxos das raízes

Os efeitos do tratamento com ácido ferúlico na composição de carboidratos e de ácidos graxos das raízes de soja, cultivadas em solução nutritiva, foram analisados por Ferrarese et al. (2001). Os resultados revelaram que o ácido ferúlico afeta significativamente os carboidratos, pelo aumento dos teores de xilose, frutose e sacarose e diminuição dos teores de glicose, após 24 horas de tratamento. O ácido ferúlico também aumentou os teores de ácidos graxos saturados e insaturados. Esses resultados parecem estar relacionados ao papel do ácido ferúlico como um indutor do estresse, podendo afetar a atividade de enzimas de síntese ou de hidrólise desses compostos.

2.5.4 Efeitos na lignificação

A redução no crescimento causada pela ação do ácido ferúlico tem sido associada à lignificação precoce e aos aumentos nas atividades de enzimas relacionadas a este processo, como as peroxidases e a fenilalanina amônia liase (SHANN; BLUM, 1987; DEVI; PRASAD, 1996; POLITYCKA, 1999; SANTOS et al., 2004). De um modo geral, o processo de lignificação aumenta a espessura da parede celular afetando sua plasticidade e diminuindo a capacidade de alongamento das células.

Shann e Blum (1987) avaliaram a utilização de ácido ferúlico na biossíntese de lignina em plântulas de pepino cultivadas em meio hidropônico. Para tanto, as plantas receberam o tratamento com ácido ferúlico marcado com ^{14}C , a fim de se observar a translocação do composto pela plântula e quantificar sua incorporação em lignina. O ácido ferúlico marcado radioativamente foi detectado em toda a plântula, sendo que o teor de lignina aumentou nas raízes e nos caules à medida que se aumentava a concentração do composto. Resíduos de lignina extraída das plântulas também indicaram a presença de radioatividade, o que demonstra a utilização do ácido ferúlico, após aplicação exógena, na síntese de lignina. As atividades das peroxidases ligadas à parede celular, que estão envolvidas na desidrogenação e na condensação dos monolignóis no polímero da lignina, também aumentaram nos tecidos que apresentaram as maiores concentrações de ^{14}C , maiores taxas de lignificação e incorporação do ácido ferúlico aplicado.

Santos et al. (2004) investigaram as variações nas atividades das peroxidases, solúvel e ligada à parede celular, da fenilalanina amônia liase (PAL) e os teores de lignina nas raízes de plântulas de soja tratadas com ácido ferúlico em solução nutritiva, e suas relações com o crescimento das raízes. Eles constataram que os teores de lignina e as atividades das enzimas aumentaram após tratamento das plântulas com o ácido ferúlico, enquanto que o crescimento e as biomassas frescas e secas diminuíram. Para esses autores, a inibição do crescimento das raízes, induzido pelo ácido ferúlico, é em virtude do enrijecimento relacionado à formação de ligações cruzadas entre polímeros da parede celular e a síntese de lignina.

2.5.5 Efeitos na atividade de enzimas

Aumentos nas atividades de enzimas relacionadas com o processo da lignificação, como as peroxidases e a PAL, são geralmente acompanhados pela redução no crescimento das raízes. Em raízes de pepino e milho, tratadas com ácido ferúlico 1 mM, a atividade da peroxidase solúvel aumentou significativamente e ocorreu juntamente com a diminuição do comprimento das raízes (SHANN; BLUM, 1987; DEVI; PRASAD, 1996; POLITYCKA, 1996).

Esses autores atribuíram os efeitos do ácido ferúlico à produção de radicais livres.

Herrig et al. (2002) avaliaram a influência dos ácidos ferúlico e vanílico nas atividades das peroxidases, solúvel e ligada à parede celular, e da PAL, relacionando com os teores de fenóis totais e o crescimento das raízes de plântulas de soja. O ácido ferúlico diminuiu o crescimento e a biomassa das raízes e aumentou o teor de fenóis totais e a atividade das peroxidases e da PAL. O aumento na atividade da PAL, a principal enzima da via dos fenilpropanóides, também se relaciona com o aumento na síntese de lignina, e pode ser a resposta das plantas aos vários estresses bióticos e abióticos, como relatado anteriormente (SANTOS et al., 2004). Tais efeitos sobre a soja também foram relatados por Suzuki et al. (2003), ao observar ainda que quando o ácido ferúlico foi aplicado simultaneamente com ácido vanílico, em solução nutritiva, os efeitos da interação dos aleloquímicos foram menores do que a soma dos efeitos de cada composto testado separadamente, o que sugere antagonismo.

A indução da lignificação, como regra, é acompanhada pelo aumento na atividade de enzimas associadas à via dos fenilpropanóides, como a peroxidase, a PAL e a cinamil álcool desidrogenase. Também foi proposto o papel essencial da peroxidase no enrijecimento das paredes celulares por meio da formação de ligações cruzadas entre os polímeros da parede e, assim, provocando redução da extensibilidade da parede celular (SANTOS et al., 2004).

Vale lembrar também que a peroxidase solúvel catalisa a oxidação de substratos fenólicos estruturalmente diversos e é freqüentemente associada como enzima antioxidante, que protege as células dos efeitos destrutivos dos radicais tóxicos de oxigênio. Entretanto, se a capacidade das células de eliminar espécies reativas ao oxigênio (ROS) é excedida, a oxidação dos ácidos fenólicos pela peroxidase solúvel leva à formação de quinonas (POLITYCKA, 1998). Conseqüentemente, esses compostos podem despolarizar a membrana celular da raiz e causar deterioração da integridade da membrana por meio da mudança na composição dos lipídios, indução da peroxidação lipídica e afetar a atividade de enzimas (SANTOS et al., 2004). Baziramakenga et al. (1995) relataram que os compostos fenólicos diminuiriam

os teores de grupos sulfidril em raízes de soja, sugerindo que essa depleção poderia levar à inativação de enzimas e provocar disfunções em proteínas carreadoras. Essas mudanças intramoleculares nos grupos sulfidril das proteínas poderia resultar em aumento da permeabilidade da membrana, causar vazamento de eletrólitos e bloquear a absorção de nutrientes, além de prejudicar o crescimento da planta (LYU; BLUM, 1990).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e condução experimental

As sementes utilizadas foram das cultivares CD-201 e CD-214RR, fornecidas pela Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – Coodetec, de Cascavel - Paraná. O ácido ferúlico (ácido 4-hidróxi-3-metoxicinâmico) e a N-fosfonometil glicina (glifosato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Missouri, USA). Os sais de tampões, sais da solução nutritiva e demais reagentes foram adquiridos da Merck, Reagen, Nuclear e Sigma.

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica Vegetal, do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá - Paraná.

3.2 Obtenção do tegumento das sementes

As sementes foram imersas em água por cerca de 12 horas. Após esse período, os tegumentos foram retirados das sementes e colocados para secar em estufa a 80°C por 16 horas. Após esse período, o material foi esfriado em dessecador a vácuo, as amostras foram trituradas e pesadas, sendo então avaliadas quanto ao teor de lignina e fenóis totais.

3.3 Obtenção das plântulas

Sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], variedade CD-201 ou CD-214RR, foram previamente desinfetadas em solução de NaClO 2% durante três minutos, e a seguir lavadas com água destilada. Em seguida, as sementes foram dispostas entre três folhas de papel de germinação Gemitest (CEL-060), umedecidas com aproximadamente três vezes sua massa, em água deionizada. Foram confeccionados rolos, acondicionados em recipientes de plástico escuro, contendo pequeno filme de água. Os recipientes foram levados

à câmara de germinação (Tecnal TE 400, Brasil) a 25°C e 80% de umidade relativa. As sementes germinaram no escuro por um período de três dias.

3.4. Sistema experimental

Para execução do protocolo experimental, foram construídos, nas oficinas da Universidade Estadual de Maringá, recipientes apropriados para cultivo das plântulas em sistema hidropônico.

Cada sistema experimental constava de um recipiente de vidro, medindo 15 cm de altura e 9 cm de diâmetro, onde era adicionada a solução nutritiva. Dentro dele, encaixava-se uma placa de acrílico com 25 perfurações de 5 mm, que servia como suporte para as plântulas. Essa placa também possuía um orifício por onde era passada uma mangueira sorológica, ligada a uma mini-bomba capaz de permitir aeração contínua da solução nutritiva (Figura 7).



Figura 7 – Sistemas de incubação das plântulas de soja em solução nutritiva.

O sistema hidropônico foi mantido em câmara de germinação com sistema de fotoperíodo de 12 horas, a $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com temperatura de 25°C e umidade de 80%. O tempo de incubação das plântulas variou entre 24 e 96 horas.

3.5 Composição da solução nutritiva tamponada

Em todos os experimentos empregou-se a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), meia força (SANTOS et al., 2004), conforme descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química da solução nutritiva.

Soluções estoque	Quantidade do sal por litro de solução estoque (g)	Quantidade da solução estoque por litro de solução nutritiva (ml)
Micronutrientes:		
KH ₂ PO ₄	136,0	1
KNO ₃	101,0	5
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,0	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,5	2
Micronutrientes:	*	1
Fe-EDTA	**	1

* Preparo da solução de micronutrientes: 2,86 g de H₂BO₃; 1,81 g de MnCl₂. 4H₂O; 0,22 g de ZnSO₄. 7H₂O; 0,08 g de CuSO₄. 5H₂O e 0,02 g de H₂SMoO₄.H₂O dissolvidos em um litro de água deionizada.

** Preparo da solução de Fe-EDTA: as soluções de FeCl₃. 6H₂O e 26,1 g de EDTA foram dissolvidos em água deionizada sob aquecimento a 50°C. Em seguida, as duas soluções foram misturadas completando o volume para um litro com água deionizada. Para o armazenamento, utilizou-se um frasco de vidro escuro sendo a solução mantida em geladeira.

Cada sistema com 25 plântulas recebia 200 ml de solução nutritiva, dos quais 50 ml eram de tampão fosfato de sódio e potássio 67 mM, pH 6,0.

3.6 Tratamentos utilizados

Os seguintes tratamentos foram aplicados na solução nutritiva: a) ácido ferúlico 1 mM; b) glifosato (N-fosfonometil-glicina) 0,5 mM; c) ácido ferúlico 1 mM + glifosato 0,5 mM e d) controle isento dos compostos em estudo.

Os teores de lignina e de fenóis totais foram avaliados no tegumento das sementes das duas cultivares.

Nas plântulas, foram avaliados o crescimento, as biomassas frescas e secas e os teores de lignina e fenóis totais das raízes, com ou sem tratamento com ácido ferúlico 1 mM, nos tempos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas. Plântulas com 48 horas de incubação foram avaliadas quanto ao crescimento, às biomassas frescas e secas, teores de lignina e de fenóis totais das raízes, com ou sem tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM e ácido ferúlico 1 mM + glifosato 0,5 mM.

3.7 Determinação do crescimento e das biomassas frescas e secas das raízes

Para determinação do crescimento, as raízes foram medidas com o uso de régua milimetrada, antes da incubação em solução nutritiva contendo, ou não, o composto isoladamente ou sua mistura, antes e após o período de incubação. A diferença das medidas constituiu a taxa de crescimento.

A biomassa fresca foi determinada pela pesagem das raízes em balança analítica, após a incubação das plântulas em solução nutritiva. A biomassa seca foi obtida pela pesagem das raízes após secagem em estufa a 80°C por 24 horas e resfriamento em dessecador a vácuo.

3.8 Determinação do teor de lignina

A extração da lignina foi efetuada, em gral de porcelana, triturando 0,3 g de matéria seca, proveniente de raízes ou tegumento, em 7 ml de tampão fosfato de sódio e potássio (50 mM, pH 7,0) e transferindo o material para um tubo de centrífuga de 15 ml (FERRARESE et al., 2002). Cada tubo constituía uma repetição. Em seguida, foi efetuada a centrifugação, a 1.500 g, por 4 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o material restante submetido a mais duas centrifugações com 7,0 ml da mesma solução tampão. O material foi ressuspensionado em 7,0 ml de Triton X-100 (dissolvido a 1% no tampão fosfato) e centrifugado, por duas vezes consecutivas, eliminando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado com 7 ml de solução de NaCl 1 M (preparado no tampão) e centrifugado. O sobrenadante foi eliminado, repetindo a operação por mais uma vez. O precipitado restante foi ressuspensionado com 7,0 ml de

água destilada e centrifugado por 4 minutos a 1.500 g, desprezando-se o sobrenadante. Em seguida, o precipitado obtido anteriormente foi ressuspenso com 7,0 ml de acetona e centrifugado por 4 minutos a 1.500 g, por duas vezes consecutivas, sendo o sobrenadante eliminado. O precipitado foi acondicionado em estufa, a 60°C, durante 24 horas, e resfriado em dessecador a vácuo. O precipitado obtido representa a parede celular, isenta de proteínas (CHEN et al., 2000). O material obtido foi acondicionado em tubos de centrífuga, com rosca, juntamente com a mistura reativa de 1,2 ml de ácido tioglicólico e 6 ml de HCl 2 M, sendo aquecido por 4 horas a 95°C, em banho-maria. Após a reação, o material foi centrifugado a 1.500 g, durante 15 minutos. O precipitado foi lavado três vezes com água destilada e o produto da reação, o ácido lignotioglicólico (LTGA), foi extraído com 7,0 ml de NaOH 0,5 M, a 30°C, por 18 horas, em banho-maria com agitação de 115 oscilações min⁻¹. A mistura resultante foi centrifugada a 1.500 g, durante 10 minutos, e o sobrenadante guardado. O precipitado obtido anteriormente foi lavado novamente com 3,0 ml de NaOH 0,5 M, centrifugado e o sobrenadante adicionado ao anterior. O sobrenadante obtido foi acidificado com 1,8 ml de HCl concentrado e acondicionado em freezer, por uma noite, para precipitar o LTGA. O material foi centrifugado e o precipitado lavado por duas vezes com água destilada, eliminando-se o sobrenadante. O LTGA obtido foi acondicionado em estufa, a 60°C, durante 24 horas sendo, em seguida, armazenado em dessecador a vácuo, até análise. A determinação do LTGA foi efetuada em espectrofotômetro a 280 nm, contra branco apropriado.

3.9 Determinação do teor de fenóis totais

Para determinação do teor de fenóis totais, foram utilizados 0,25 g de matéria seca triturada (raízes ou tegumento). A matéria seca foi colocada em pequenos recipientes de vidro com tampa-rosca, contendo 5 ml de solução de HCl 2 N. Os frascos foram levados à fervura durante 30 minutos, para realização da digestão. Após a fervura e o resfriamento, o material foi filtrado por meio de papel-filtro. O filtrado obtido foi diluído 150 vezes com água destilada. A 5 ml do filtrado diluído foram acrescentados 0,75 ml de NaCO₃ 1,9 M e 0,25 ml de reagente de Folin-Ciocalteu. A reação ocorreu no escuro por

uma hora e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 750 nm (HERRIG et al., 2002).

3.10 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Foram realizadas quatro repetições, para a avaliação de todas as variáveis (biomassas frescas e secas das raízes, comprimento das raízes, teores de lignina e de fenóis totais). Os tratamentos foram dispostos no esquema fatorial 2 x 2 x 4 sendo duas cultivares (CD-201 e CD-214RR), dois tratamentos (controle e ácido ferúlico 1 mM), e quatro níveis de tempo (24, 48, 72 e 96 horas de incubação) ou 2 x 4 (duas cultivares e quatro tratamentos).

Em seguida, procedeu-se a análise de variância dos dados e, na presença de interações significativas, foram efetuados os desdobramentos necessários. A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa SISVAR, da Universidade Federal de Lavras – MG.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teores de lignina e de fenóis totais no tegumento das sementes

A execução dos experimentos realizados neste trabalho, com tegumentos das sementes das duas cultivares, teve por objetivo avaliar o potencial das técnicas de dosagem de lignina e de fenóis totais como possíveis alternativas para a diferenciação de soja convencional da transgênica.

A complexidade estrutural da molécula de lignina é fato que dificulta sua quantificação em diferentes tecidos. Isto ocorre porque a maioria das técnicas usadas para este fim envolve leituras na faixa do ultravioleta, mais especificamente em comprimento de onda de 280 nm. É sabido que nesta faixa espectral, proteínas e compostos aromáticos absorvem energia e, portanto, a presença destas substâncias pode interferir na quantificação da lignina. Diante disto, é importante destacar que vários autores têm divulgado seus resultados recorrendo à clássica técnica de determinação gravimétrica da lignina (FERREIRA, 2003). Vale ressaltar que a metodologia para determinação do teor de lignina utilizada neste trabalho foi desenvolvida com o intuito de eliminar interferências presentes em outras técnicas. Ela se baseia em uma estratégia utilizada para retirar as proteínas interferentes, permitindo uma análise mais precisa da lignina. Chen et al. (2000) desenvolveram esta técnica para dosar lignina em raízes de pepino (*Cucumis sativus* L.). Para isto, os autores recorreram a tratamentos do tecido em análise que permitiram eliminar interferentes protéicos e, conseqüentemente, evitar leituras espectrofotométricas superestimadas. Levando em conta que os dados obtidos foram efetuados com raízes de pepino, Ferrarese et al. (2002) adaptaram a técnica para raízes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), o qual pôde ser estendida aos tegumentos de suas sementes por Ferreira (2003),

Pode ser observado, na Tabela 2, que os tegumentos das cultivares CD-201 e CD-214RR não apresentaram diferença significativa, pelo Teste F a 5% de probabilidade, em relação ao teor de lignina.

Tabela 2 – Teor de lignina (mg LTGA g tegumento⁻¹) e fenóis totais (mg g tegumento⁻¹) dos tegumentos das sementes das cultivares CD-201 e CD-214RR¹.

Cultivar	Lignina	Fenóis totais
CD-201	2,63	2,36
CD-214RR	2,53	2,94 *

¹ Médias seguidas de asterisco, na mesma coluna, diferem significativamente, pelo Teste F a 5% de probabilidade.

Já em relação ao teor de fenóis totais, ocorreu diferença significativa entre as duas cultivares, sendo que a cultivar CD-214RR apresentou maior quantidade (19,7%) que a cultivar CD-201, por meio de análise pelo Teste F a 5% de probabilidade.

Em outro trabalho desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Vegetal (ZONETTI, 2007), foi analisado o teor de fenóis totais do tegumento das cultivares de soja CD-213RR, transgênica, e OC-14, convencional parental. Nesse caso, a cultivar transgênica também apresentou teores de fenóis totais significativamente mais altos. Se este resultado se repetir na análise de outras cultivares convencionais e transgênicas, a técnica de dosagem de fenóis totais poderá se tornar boa alternativa para a diferenciação de material convencional do transgênico. Esta análise seria tecnicamente interessante haja vista o rápido alcance dos resultados, isto é, cerca de um dia para se obter o tegumento seco, e mais duas horas para a determinação quantitativa dos fenóis totais. Outro fato a destacar seria a quantificação destes compostos fenólicos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação e quantificação de ácidos fenólicos (derivados de ácido cinâmico ou de ácido benzóico) poderiam indicar a possível existência de um marcador bioquímico específico para soja modificada geneticamente.

4.2 Influência do ácido ferúlico 1 mM sobre a soja convencional e transgênica em quatro períodos de incubação

4.2.1 Influência no crescimento e nas biomassas frescas e secas

Nos experimentos, as plântulas foram incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas em solução nutritiva contendo, ou não, o tratamento com ácido ferúlico 1 mM.

O crescimento das raízes de soja foi obtido pela medida do comprimento das raízes antes e após a incubação, sendo a variável obtida pelo valor da diferença entre essas duas medidas. Os resultados da Tabela 3 indicam que o tratamento com ácido ferúlico foi significativo ($P < 0,05$), ocasionando reduções no crescimento das raízes, em 61% para a CD-201 e 65% para a CD-214RR, em média, quando comparados com os respectivos controles.

Tabela 3 – Crescimento médio (cm) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, controle (C) e tratamento (AF) com ácido ferúlico 1 mM por 24, 48, 72 e 96 horas de incubação¹.

	Tempo de incubação (horas)			
	24	48	72	96
CD-201 C	2,33 D a	4,42 C b	6,83 B b	8,36 A a
CD-201 AF	1,21 C b	1,52 C c	2,10 B c	3,83 A b
CD-214 C	2,56 D a	5,47 C a	7,71 B a	8,69 A a
CD-214 AF	1,22 C b	1,65 C c	2,19 B c	3,57 A b

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974), respectivamente, a 5% de probabilidade.

Dentro do controle, foram constatadas diferenças significativas (teste F a 5% de probabilidade) entre as cultivares CD-201 e CD-214RR, sendo que a transgênica apresentou as maiores taxas de crescimento. Realizando-se os desdobramentos das variedades em função do tempo e tratamento, observou-se que essa diferença ocorreu nos tempos de incubação de 48 e 72 horas. Em

48 horas, o crescimento da cultivar transgênica foi 19% maior que da convencional e em 72 horas, 11%.

Dentro do tratamento não foi notada diferença significativa entre as duas cultivares. Observa-se, pelos resultados da Tabela 3, que o crescimento das raízes sob tratamento ocorreu de maneira mais lenta, não ocorrendo diferença significativa entre 24 e 48 horas, e aumentando principalmente após 96 horas de incubação.

Como pode ser notado pela Figura 8, o aumento do tempo de incubação promoveu incremento linear no crescimento das raízes do controle da cultivar CD-201, sendo que para cada intervalo de 24 horas foi obtido um aumento de 0,085 no crescimento. Com o tratamento com ácido ferúlico, a tendência observada na regressão foi quadrática, com ponto de mínima de 32,3 horas de incubação e 1,23 cm de crescimento. Na Figura 9, observa-se que tanto o controle como o tratamento da cultivar CD-214RR apresentaram comportamento quadrático, sendo o ponto de mínima do tratamento de 25 horas de incubação.

Esses resultados podem ser explicados com base nos efeitos do ácido ferúlico na lignificação que, como é sabido, aumenta a espessura das paredes celulares. Esse espessamento dificulta o alongamento das células e o crescimento das raízes, o que pode ser observado pelo aspecto das raízes tratadas, que apresentam menos flexibilidade que as raízes que não receberam nenhum tratamento. Recorrendo ao uso da microscopia eletrônica de varredura, Santos et al. (2005) observaram que o ápice das raízes de soja que receberam tratamento com ácido ferúlico apresentava descamação do tecido meristemático, o que também pode afetar negativamente o crescimento das raízes.

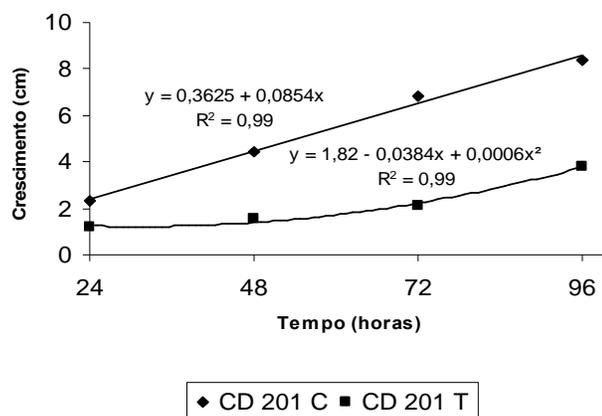


Figura 8 – Crescimento médio das raízes da variedade CD-201, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva.

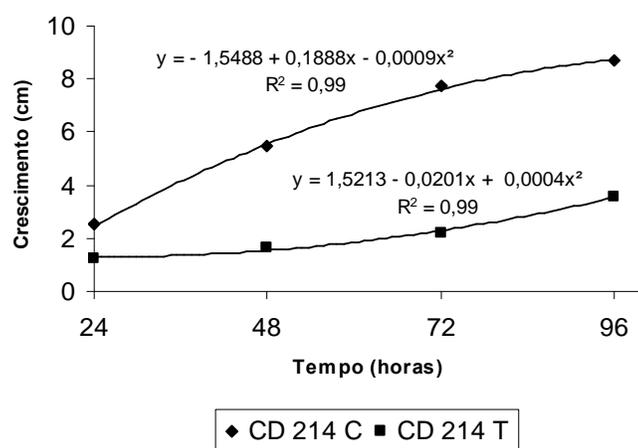


Figura 9 – Crescimento médio das raízes da variedade CD-214RR, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva.

O tratamento com ácido ferúlico também diminuiu a biomassa fresca das raízes, em 32% para CD-201 e 31% para CD-214RR, em média, comparando-se com as raízes não-tratadas. Entretanto, não ocorreram diferenças significativas entre as cultivares (Tabela 4).

Tabela 4 – Médias de biomassa fresca das raízes (g plântula⁻¹) das cultivares CD-201 e CD-214RR, controle (C) e tratamento (AF) com ácido ferúlico, por 24, 48, 72 e 96 horas de incubação¹.

	Tempo de incubação (horas)			
	24	48	72	96
CD-201 C	0,11 D a	0,17 C a	0,26 B a	0,32 A a
CD-201 AF	0,11 B a	0,12 B b	0,12 B b	0,24 A b
CD-214 C	0,12 C a	0,16 C a	0,23 B a	0,29 A a
CD-214 AF	0,09 B a	0,11 B b	0,14 B b	0,21 A b

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974) e Teste F, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Dentro do tratamento, não ocorreu aumento significativo da biomassa fresca entre os tempos de 24 e 72 horas de incubação para as duas cultivares.

Nas duas cultivares, não se constatou efeito do tratamento com ácido ferúlico após 24 horas de incubação, em relação à biomassa fresca, isto é, controle e tratamento não diferiram significativamente. Por outro lado, a partir de 48 horas, a biomassa fresca das raízes apresentou uma redução significativa quando comparada à do controle (Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade).

Realizando-se a análise de regressão, constatou-se que, na cultivar CD-201, o controle teve comportamento linear em relação ao aumento da biomassa em função do tempo, com um incremento de 0,07g a cada 24 horas de incubação. Já dentro do tratamento a linha de tendência foi cúbica, com ponto de mínimo de 60 horas e ponto de máxima de 96 horas de incubação (Figura 10).

Na cultivar CD-214RR (Figura 11), tanto o controle como o tratamento se comportaram de modo quadrático, com ponto de mínima de 25 horas de incubação.

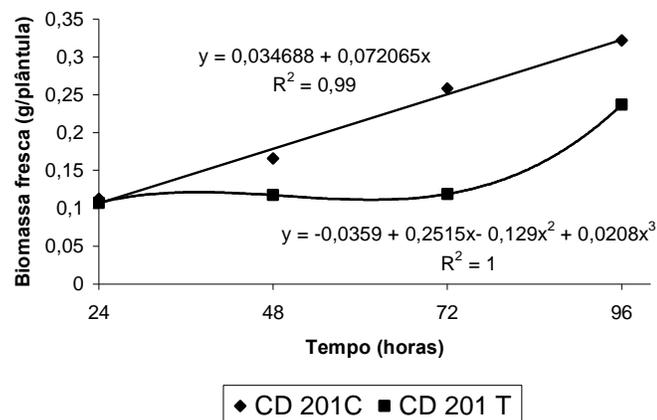


Figura 10 – Médias da biomassa fresca das raízes (mg plântula⁻¹) da variedade CD-201, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva.

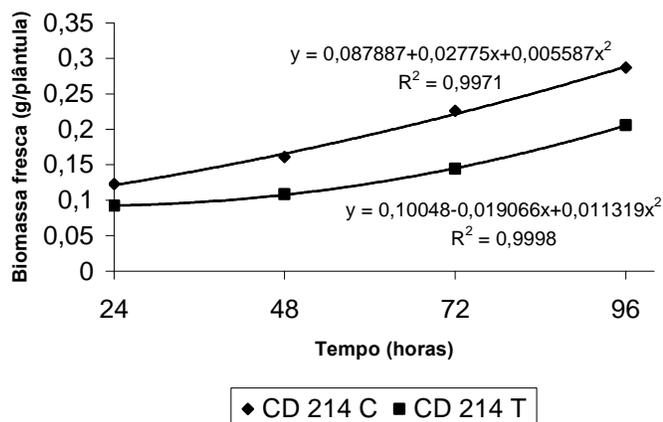


Figura 11 – Médias da biomassa fresca das raízes (mg plântula⁻¹) da variedade CD-214RR, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva.

Em relação à biomassa seca (Tabela 5), o tratamento com ácido ferúlico provocou reduções significativas: 17% para a cultivar CD-201 e 23% para a cultivar CD-214RR, comparando-se com os respectivos controles. Não ocorreram, entretanto, diferenças significativas entre as cultivares.

Tabela 5 – Médias da biomassa seca das raízes (g plântula⁻¹) das cultivares CD-201 e CD-214RR, controle (C) e tratamento (AF) com ácido ferúlico, em 24, 48, 72 e 96 horas de incubação¹.

	Tempo de incubação (horas)			
	24	48	72	96
CD-201 C	0,007 B a	0,010 B a	0,014 A a	0,017 A a
CD-201 AF	0,008 B a	0,008 B a	0,009 B b	0,015 A a
CD-214 C	0,008 B a	0,012 A a	0,013 A a	0,015 A a
CD-214 AF	0,006 B a	0,007 B b	0,010 A a	0,013 A a

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974) e Teste F, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Embora a interação variedade ‘versus’ tratamento não tenha sido significativa (Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade), o desdobramento dos dados indicou que houve diferença entre os controles e os tratamentos com o ácido ferúlico. No caso da cultivar CD-201, só ocorreu diferença significativa entre o controle e o tratamento após 72 horas de incubação. Na cultivar CD-214RR, essa diferença ocorreu com 48 horas de incubação. O fato de a biomassa seca ter apresentado menor diferença entre controle e tratamento, ao contrário da biomassa fresca, pode ser explicado pelo fato das raízes tratadas apresentarem maior número de raízes laterais e maior espessamento das paredes celulares das células. Como já relatado, o processo de lignificação que ocorre na presença de ácido ferúlico contribui para o aumento da biomassa seca em relação às raízes não-tratadas.

Um fato interessante é que a inibição do crescimento foi mais pronunciada no período entre 24 e 48 horas, aumentando significativamente após esse período. A biomassa sofreu suas maiores reduções no período entre 48 e 72 horas, mas com 96 horas de incubação, a biomassa seca do tratamento chegou a se igualar, estatisticamente, com a do controle. Todavia, como dito anteriormente, isso pode ser explicado pelo aumento da lignificação e da formação de raízes laterais.

Ao realizar a análise de regressão, constatou-se que, na cultivar CD-201, o controle teve comportamento cúbico em relação ao aumento da biomassa em função do tempo, com ponto de mínima de 24 horas e ponto de máxima de 96 horas de incubação. Já, dentro do tratamento, a linha de tendência foi quadrática, com ponto de mínima de 35 horas de incubação (Figura 12).

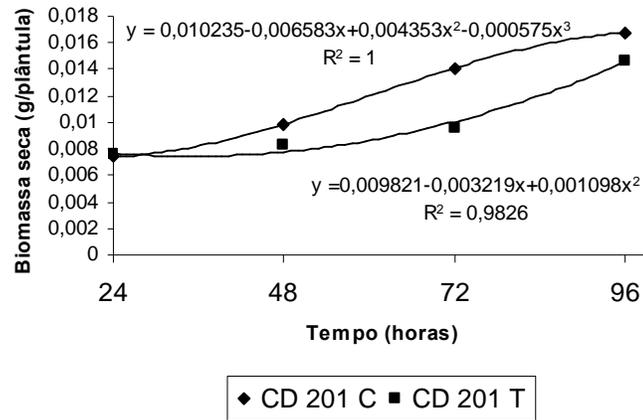


Figura 12 – Médias da biomassa seca das raízes (mg plântula⁻¹) da variedade CD-201, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva.

Na cultivar CD-214RR (Figura 13), tanto o controle como o tratamento se comportou (fiquei em dúvida se pode deixar no singular, pois controle e tratamento se comportaram de modo quadrático) de modo quadrático, com ponto de mínima de 24 horas.

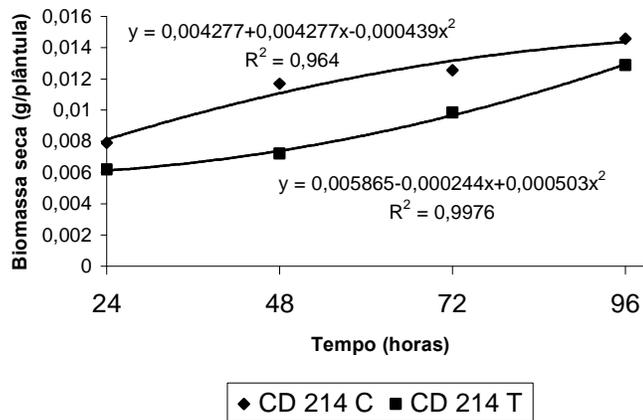


Figura 13 – Médias da biomassa seca das raízes (mg plântula⁻¹) da variedade CD-214RR, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva.

Vários pesquisadores têm relatado alterações no crescimento das raízes de diferentes plantas submetidas ao ácido ferúlico. Por exemplo, o comprimento do hipocótilo de feijão mungo (*Phaseolus aureus* L.) diminuiu cerca de 40% após tratamento com ácido ferúlico 1 mM (DEMOS et al., 1975). Vaughan e Ord (1990) constataram que o comprimento da raiz e a biomassa fresca de ervilha (*Pisum sativum* L.) foram significativamente inibidos (>70%) pelo aleloquímico a 1 mM. Como Devi e Prasad (1996) relataram, a aplicação exógena de ácido ferúlico, a 1 mM, reduziu o crescimento das plântulas de milho (*Zea mays* L.) afetando os caules (>60%) e as raízes (>40%). A aplicação exógena de ácido ferúlico, em menores concentrações, também afetou o crescimento das plantas. A 0,4 mM, o ácido ferúlico causou considerável decréscimo no comprimento da raiz (>21%) e na biomassa seca (>30%) de plântulas de sorgo (*Sorghum bicolor* Moench.) como demonstrado por Einhellig e Eckrich (1984). Segundo Blum e Rebbeck (1989), a 0,25 mM, o aleloquímico inibiu a alongação da raiz, estimulou a iniciação das raízes secundárias e aumentou a razão raiz/caule em plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.). Em soja, Patterson (1981) demonstrou que o ácido ferúlico, a 1 mM, significativamente reduziu a biomassa seca total (>45%). Santos et al. (2004) relataram que após 24 horas de tratamento com ácido ferúlico, na mesma concentração, as raízes foram inibidas em 71% e as biomassas frescas e secas em 23% e 20%, respectivamente, em comparação com experimentos-controle. De um modo geral, os resultados do presente trabalho estão em concordância com aqueles obtidos pelos pesquisadores arrolados anteriormente.

No que se refere aos efeitos de compostos alelopáticos no crescimento de plantas transgênicas, as informações são escassas. Excetuando os resultados obtidos por NG et al. (2003), que constataram reduções significativas no comprimento da raiz primária (35%) e na biomassa fresca (43%) de canola não havia, até o momento, dados sobre possíveis efeitos do ácido ferúlico em plantas transgênicas.

4.2.2 Influência na lignificação

A produção de lignina nas raízes, com ou sem tratamento com o ácido ferúlico, pode ser vista na Tabela 6. Os resultados indicam que a lignificação aumentou significativamente com o tempo de incubação, tanto no controle como no tratamento. Entretanto, o ácido ferúlico aumentou os teores de lignina nas duas cultivares em função do tempo, e em comparação com seus respectivos controles.

Tabela 6 – Teor de lignina (mg LTGA g raiz⁻¹) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, controle (C) e tratamento (AF) com ácido ferúlico, em 24, 48, 72 e 96 horas de incubação¹.

	Tempo de incubação (horas)			
	24	48	72	96
CD-201 C	10,43 C a	14,82 B b	17,87 A b	19,59 A b
CD-201 AF	12,09 D a	17,54 C a	22,93 B a	28,59 A a
CD-214 C	10,62 C a	16,09 B b	17,49 B b	21,16 A b
CD-214 AF	12,23 D a	18,99 C a	21,71 B a	28,99 A a

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974) e Teste F, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Os resultados revelaram que os teores de lignina aumentaram 22,8% na cultivar CD-201 e 20,2% na CD-214RR, em média, em comparação com os controles. Entretanto, não foram constatadas diferenças significativas entre as cultivares, por meio da média dos períodos de incubação. Por outro lado, após a realização dos desdobramentos de cultivar dentro do tempo e tratamento observou-se ocorrência de diferença significativa entre as cultivares no período de 48 horas de incubação com ácido ferúlico, sendo que a CD-214RR apresentou a maior média. Não foi constatada diferença significativa entre o controle e o tratamento no tempo de incubação de 24 horas, para as duas cultivares.

As regressões da Figura 14 permitem inferir que na cultivar CD-201, tanto o controle como o tratamento apresentou tendência linear, com

incremento de 0,13 e 0,23 mg LTGA/ g raiz a cada 24 horas, respectivamente, sendo esse comportamento observado também na cultivar CD-214RR, tanto no controle como no tratamento (Figura 15), com incremento de 0,14 e 0,22 mg LTGA/ g raiz a cada 24 horas, respectivamente.

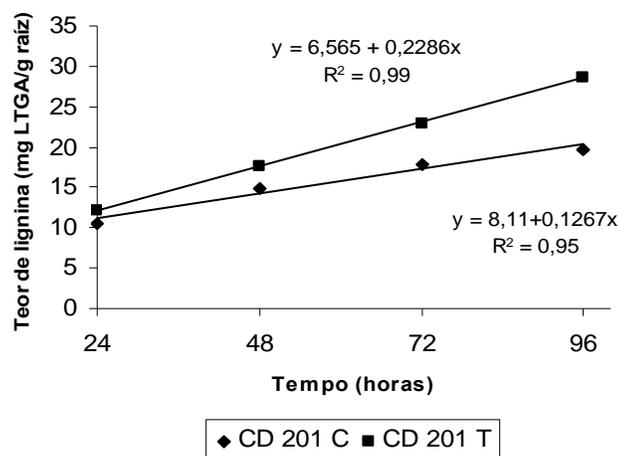


Figura 14 – Médias do teor de lignina das raízes (mg LTGA g raiz⁻¹) da variedade CD-201, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva.

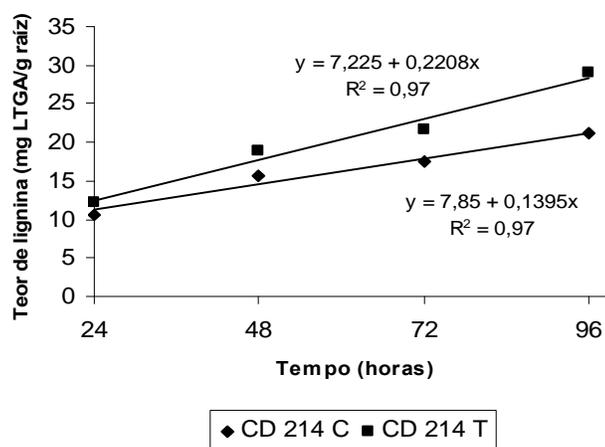


Figura 15 – Médias do teor de lignina das raízes (mg LTGA g raiz⁻¹) da variedade CD-214RR, controle (C) e tratamento com ácido ferúlico 1 mM (T), entre 24 e 96 horas de incubação em solução nutritiva.

Com respeito ao processo de lignificação das raízes de plantas não-transgênicas, aumentos nos teores de lignina e de enzimas relacionadas a este processo (peroxidase e fenilalanina amônia liase) e associados à redução no crescimento das raízes têm sido relatados por outros autores. Shann e Blum (1987) observaram que [¹⁴C]-ácido ferúlico foi incorporado nos resíduos de lignina isolada de raízes de pepino. Concomitantemente, eles observaram aumentos nos teores de lignina e redução no comprimento das raízes. Comportamento semelhante foi constatado por Devi e Prasad (1996) em raízes de milho e por Politycka (1999) em raízes de pepino. Santos et al. (2004) observaram que, na mesma concentração (1 mM) e com tempo de incubação de 48 horas, condições aplicadas neste trabalho, os teores de lignina das raízes de soja (cultivar BRS-133) aumentaram em 39%, associado à significativa redução no crescimento. Para esses autores, a inibição do crescimento das raízes, induzido pelo ácido ferúlico, é em virtude do enrijecimento relacionado à formação de ligações cruzadas entre polímeros da parede celular e a síntese de lignina. Levando em conta a inexistência de diferenças significativas nos resultados de lignina entre as cultivares estudadas nesse trabalho (Tabela 7), supõe-se que o mecanismo sugerido pelos citados autores seja o mesmo para a soja transgênica. Evidentemente, futuros experimentos serão necessários para avaliar o papel das enzimas relacionadas à lignificação das raízes de soja transgênica quando submetidas ao ácido ferúlico, para confirmação desta hipótese.

4.2.3 Considerações finais

Como apresentado nesse trabalho (Tabelas 3 a 5), o aleloquímico efetivamente reduziu o crescimento das raízes e as biomassas das cultivares CD-201 e CD-214-RR. Foi constatada diferença significativa na taxa de crescimento das raízes das cultivares sem tratamento, porém esse comportamento não se repetiu na biomassa nem dentro do tratamento com o aleloquímico. Portanto, é apropriado destacar que os efeitos do ácido ferúlico no crescimento das plântulas (comprimento e biomassas das raízes) não foram significativamente diferentes entre as duas cultivares.

Em suma, é importante relevar que não ocorreram diferenças significativas entre as duas cultivares, utilizando-se o tratamento com o ácido ferúlico. Por conseguinte, e ao menos para as condições experimentais adotadas nesse trabalho, a modificação genética efetuada para a obtenção da cultivar de soja transgênica não forneceu resistência ao aleloquímico, no tocante ao crescimento e à lignificação das raízes.

4.3 Influência do tratamento com ácido ferúlico e/ou glifosato no crescimento, nas biomassas frescas e secas, nos teores de lignina e de fenóis totais das raízes, após 48 horas de incubação.

Nessa etapa do trabalho, as plântulas foram incubadas por 48 horas em solução nutritiva contendo ou não o tratamento com glifosato 0,5 mM, ácido ferúlico 1 mM ou glifosato 0,5 mM simultaneamente com ácido ferúlico 1 mM. Os resultados sobre o crescimento das raízes podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 – Crescimento médio (cm) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, submetidas ou não ao tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM, ou glifosato 0,5 mM + ácido ferúlico 1 mM, por 48 horas¹.

	Controle	Ácido ferúlico 1 mM	Glifosato 0,5 mM	Glifosato 0,5 mM + Ácido ferúlico 1 mM
CD-214RR	5,47 A a	1,65 B a	5,42 A a	1,44 B a
CD-201	4,43 A b	1,52 B a	1,54 B b	1,23 B a

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974) e Teste F, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Em relação ao crescimento das raízes, após 48 horas, observa-se que somente os tratamentos que contém ácido ferúlico diminuíram o crescimento na cultivar transgênica. O glifosato, como era de se esperar, não afeta essa cultivar em relação a essa variável. A cultivar CD-201 teve seu crescimento afetado, na mesma intensidade, quando tratada com ácido ferúlico, glifosato ou

as duas drogas juntas. No tratamento com glifosato, a cultivar CD-214 apresentou crescimento 71% maior que na cultivar CD-201.

Diferença significativa no crescimento dos controles das duas cultivares foi constatada: a CD-214RR apresentou crescimento 19% maior que a CD-201. Conforme apresentado anteriormente, esta diferença foi observada nos períodos de 48 e 72 horas de incubação, mas não se mantiveram nos demais períodos.

Com relação à biomassa fresca (Tabela 8), pode-se notar diferença entre as duas cultivares no tratamento com o glifosato, sendo que a cultivar transgênica apresentou uma média 32% maior. Apenas os tratamentos contendo ácido ferúlico interferiram na biomassa fresca da cultivar CD-214RR, enquanto que na CD-201, os dois compostos induziram reduções significativas.

Tabela 8 – Biomassa fresca (g plântula⁻¹) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, submetidas ou não ao tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM, ou glifosato 0,5 mM + ácido ferúlico 1 mM por 48 horas¹.

	Controle	Ácido ferúlico 1 mM	Glifosato 0,5 mM	Glifosato 0,5 mM + Ácido ferúlico 1 mM
CD-214RR	0,161 A a	0,108 B a	0,139 A a	0,095 B a
CD-201	0,166 A a	0,117 B a	0,094 B b	0,084 B a

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974) e Teste F, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Plântulas da cultivar CD-201, tratadas com glifosato, apresentaram redução de 37 e 25% na biomassa seca (Tabela 9), após respectivas comparações com o controle da cultivar CD-201 e com a cultivar CD-214RR, após tratamento com glifosato.

Tabela 9 – Biomassa seca (g plântula⁻¹) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, submetidas ou não ao tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM, ou glifosato 0,5 mM + ácido ferúlico 1 mM por 48 horas¹.

	Controle	Ácido ferúlico 1 mM	Glifosato 0,5 mM	Glifosato 0,5 mM + Ácido ferúlico 1 mM
CD-214RR	0,0117 A a	0,0072 B a	0,0083 B a	0,0063 B a
CD-201	0,0099 A a	0,0083 A a	0,0062 B b	0,0059 B a

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974) e Teste F, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Na cultivar CD-201, o ácido ferúlico não diminuiu a biomassa seca quando comparado com o controle, como ocorrido com a biomassa fresca e o crescimento. Isso pode ser atribuído a dois fatos: primeiro, o enrijecimento observado nas raízes tratadas com o aleloquímico, que apresentaram maior lignificação, tornando as paredes celulares mais espessas e segundo, à indução de raízes laterais, que também crescem menos em comprimento, porém se tornam mais espessas.

Santos et al. (2005), após submeterem plântulas de soja ao tratamento com ácido ferúlico em solução nutritiva durante 48 horas, relataram que as raízes das plântulas tratadas apresentaram tecido meristemático apical mais compactado que no controle, xilema primário completamente diferenciado, com células do metaxilema mais espessas em virtude da lignificação e maior quantidade de pêlos absorventes e raízes laterais. As células da coifa se apresentaram descamadas. Estas observações explicam a manutenção da biomassa seca nos mesmos níveis do controle, embora a taxa de crescimento seja menor.

Já, os tratamentos com glifosato ou com ácido ferúlico em conjunto com o herbicida, diminuíram a biomassa seca da cultivar CD-201 com a mesma intensidade. Como o ácido ferúlico isoladamente não afeta essa variável, pode-se concluir que o tratamento que diminui a biomassa é os que apresentam glifosato. As plântulas tratadas com o herbicida apresentaram

raízes laterais atrofiadas, reduzidas a pequenas calosidades, além de crescimento diminuído.

As plântulas da cultivar CD-214RR tratadas com glifosato apresentaram menor biomassa seca do que as do controle, embora não tenha sido observada diferença no crescimento e na biomassa fresca.

Em relação ao teor de lignina (Tabela 10), pode ser constatado que em havendo a presença de ácido ferúlico, nas duas cultivares, ocorre aumento significativo na síntese da lignina.

Após tratamento com glifosato, a determinação de lignina revelou diferença significativa entre as duas cultivares. O glifosato não afetou a síntese de lignina na cultivar transgênica, mas diminuiu significativamente seu teor na cultivar convencional. As plântulas da cultivar CD-201, tratadas com glifosato, apresentaram redução de 14 e 24% no teor de lignina, comparando respectivamente com o controle da cultivar CD-201 e com a cultivar CD-214RR, após tratamento com glifosato.

Tabela 10 – Teor de lignina (mg LTGA g raiz⁻¹) das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, submetidas ou não ao tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM, ou glifosato 0,5 mM + ácido ferúlico 1 mM por 48 horas¹.

	Controle	Ácido ferúlico 1 mM	Glifosato 0,5 mM	Glifosato 0,5 mM + Ácido ferúlico 1 mM
CD-214RR	15,61 C a	18,99 A a	16,80 B a	17,06 B a
CD-201	14,98 B a	17,54 A b	12,84 C b	14,32 B b

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974) e Teste F, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Em termos gerais, isso reforça o potencial desta técnica espectrofotométrica para se diferenciar cultivares convencionais das transgênicas. A diferença na produção de lignina se deve ao fato de que, na cultivar convencional, o glifosato bloqueia a atividade da EPSP sintase, o que

interfere na via de síntese da fenilalanina, precursor dos monolignóis que posteriormente são incorporados na lignina.

Tabela 11 – Teor de fenóis das raízes das cultivares CD-201 e CD-214RR, submetidas ou não ao tratamento com ácido ferúlico 1 mM, glifosato 0,5 mM, ou glifosato 0,5 mM + ácido ferúlico 1 mM por 48 horas¹.

	Controle	Ácido ferúlico 1 mM	Glifosato 0,5 mM	Glifosato 0,5 mM + Ácido ferúlico 1 mM
CD-214RR	4,94 B a	5,11 B a	4,44 C a	5,41 A a
CD-201	4,55 B b	5,39 A a	4,60 B a	5,49 A a

¹ Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, ou da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem a um mesmo grupo, de acordo com o critério de agrupamento de Scott-Knott (1974) e Teste F, respectivamente, a 5% de probabilidade.

Em relação ao teor de fenóis totais, a cultivar transgênica apresentou maior teor (8% a mais) que a cultivar convencional, dentro do controle (Tabela 11). Como pode ser notado, tal comportamento havia sido observado igualmente na análise do tegumento (Tabela 2).

Na cultivar CD-201, o tratamento com ácido ferúlico estimulou a produção de fenóis ao contrário do glifosato que não interferiu nessa variável. Os efeitos do ácido ferúlico na produção de fenóis totais, na soja convencional, já haviam sido relatados por Herrig et al. (2002), que observaram aumento significativo na síntese desses compostos na presença de ácido ferúlico e vanílico.

Por outro lado, na cultivar CD-214RR, a presença de ácido ferúlico não aumentou significativamente o teor de fenóis totais, enquanto que o glifosato diminuiu essa variável em relação ao controle. De qualquer forma, observa-se na Tabela 11 que a presença do ácido ferúlico, como na cultivar CD-201, estimula a síntese de fenóis.

O dado interessante é que, para as cultivares avaliadas nesse trabalho, não foi necessário o emprego de nenhum tratamento para que se pudesse diferenciar a cultivar transgênica da convencional, o que torna a técnica de

dosagem de fenóis mais prática para essa finalidade. Antes disso, é necessário realizar a mesma dosagem em outras cultivares convencionais e transgênicas, com o intuito de verificar se esses resultados são reprodutíveis e se é possível o desenvolvimento de padrões para que essa técnica possa ser amplamente utilizada.

5 CONCLUSÕES

1. As cultivares de soja, convencional e transgênica, avaliadas nesse trabalho, apresentaram comportamento semelhante em relação ao crescimento, as biomassas frescas e secas das raízes e aos teores de lignina, quando submetidas ao ácido ferúlico. Isso indica que a modificação genética da soja transgênica não interfere na via de síntese de lignina.

2. O tratamento com glifosato, além de reduzir o crescimento e biomassa da cultivar convencional, reduziu também o teor de lignina das raízes, o que mostra que a técnica de dosagem de lignina utilizada nesse trabalho pode ser empregada para diferenciar a soja convencional de transgênica. Para tanto, esses resultados devem apresentar reprodutibilidade após análises de outras cultivares convencionais e transgênicas.

3. Quanto ao teor de fenóis totais, as cultivares diferiram significativamente, sendo que a cultivar transgênica apresentou maiores médias no tegumento e nas raízes sem tratamento. Estes resultados, que também devem ser confirmados em outras cultivares convencionais e transgênicas, sugerem que a técnica de determinação de fenóis totais poderá se tornar uma alternativa simples, rápida e não dispendiosa para diferenciar material convencional de transgênico, além da vantagem de não necessitar de nenhum tipo de tratamento.

REFERÊNCIAS

BAZIRAMAKENGA, R.; LEROUX, G.D.; SIMARD, R.R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, p. 1271-1285, 1995.

BERGMARK, C.L.; JACKSON, W.A.; VOLK, R.J.; BLUM, U. Differential inhibition by ferulic acid of nitrate and ammonium uptake in *Zea mays* L. **Plant Physiology**, v. 98, p. 639-645, 1992.

BOOKER, F.L.; BLUM, U.; FISCUS, E.L. Short-term effects of ferulic acid on ion uptake and water relations in cucumber seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 250, p.649-655, 1992.

BLUM, U.; DALTON, B.R. Effects of ferulic acid, an allelopathic compound, on leaf expansion of cucumber seedlings grown in nutrient culture. **Journal of Chemical Ecology**, v. 11, p. 279-301, 1985.

BLUM, U.; REBBECK, J. Inhibition and recovery of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, p. 917-928, 1989.

BOOKER, F.L.; BLUM, U.; FISCUS, E.L. Short-term effects of ferulic acid on ion uptake and water relations in cucumber seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 649-655, 1992.

BRACCINI, A.L.; ELIAS, H.T.; SILVÉRIO, L.; BATISTA, F. **Transgênicos: panorama geral e métodos de detecção**. Maringá: EDUEM, 2004. 27 p. (Coleção Fundamentum, n.10).

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.

CHEN, M.; SOMMER, A.J.; McCLURE, J.W. Fourier transform-IR determination of protein contamination in thioglycolic acid lignin from radish seedlings, and improved methods for extractive-free cell wall preparation. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 153-159, 2000.

CUNHA, C.S.M.; TILLMANN, M.A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B.; BALERINI, F. Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 167-175, 2005.

DELANNAY, X.; BAUMAN, T.T.; BEIGHLEY, D.H.; BUETTNER, M.J.; COBLE, H.D.; DEFELICE, M.S.; DERTING, C.W.; DIEDRICK, T.J.; GRIFFIN, J.L.; HAGOOD, E.S.; HANCOCK, F.G.; HART, S.E.; LAVALLEE, B.J.; LOUX, M.M.; LUESCHEN, W.E.; MATSON, K.W.; MOOTS, C.K.; MURDOCK, E.; NICKELL, A.D.; OWNE, M.D.K.; PASHAL, E.H.; PROCHASKA, L.M.; RAYMOND, P.J.; REYNOLDS, D.B.; RHODES, W.K.; ROETH, F.W.; SPRANKLE, P.L.; TAROCHIONE, L.J.; TINIUS, C.N.; WALKER, R.H.; WAX, L.M.; WEIGELT, H.D.; PADGETTE, S.R. Yeald evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment with glyphosate. **Crop Science**, v. 35, p. 1461-1467, 1995.

DEMOS, E.K.; WOOLWINW, M.; WILSON, R.H.; MCMILLAN, C. The effects of ten phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial metabolism of mung bean. **American Journal of Botany**, v. 62, p. 97-102, 1975.

DEVI, S.; PRASAD, M.N.V. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. **Biologia Plantarum**, v. 38, p. 387-395, 1996.

EINHELLIG, F.A.; ECKRICH, P.C. Interactions of temperature and ferulic acid stress on grain sorghum and soybeans. **Journal of Chemical Ecology**, v. 10, p. 161-170, 1984.

FERRARESE, M.L.L. **Absorção do ácido ferúlico e seus efeitos em raízes de soja (*Glycine max* L. Merrill)**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2000. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).

FERRARESE, M.L.L.; SOUZA, N.E.; RODRIGUES, J.D.; FERRARESE-FILHO, O. Carbohydrate and lipid status in soybean roots influenced by ferulic acid uptake. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 23, n. 4, p. 421-427, 2001.

FERRARESE, M.L.L.; ZOTTIS, A.; FERRARESE-FILHO, O. Protein-free lignin quantitation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) roots. **Biologia, Section Botany**, v. 57, p. 541-543, 2002.

FERREIRA, I.C. **Lignina de tegumentos de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e suas relações com a resistência aos danos mecânicos**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2003. 43p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. Glyphosate's molecular mode of action. In: _____. **Glyphosate: a unique global herbicide**. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997. p. 521-615. (ACS monograph, 189).

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. **Glifosato**: alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. São Paulo: ACADCOM Gráfica e Editora Ltda, 2005. 67p.

GAZZIERO, D.L.P.; BRIGHENTI, A.M.; VOLL, E.; VAL, W.M.C.; FRANÇANETO, J.B. **Efeitos da aplicação de glyphosate em diferentes estádios de desenvolvimento da soja transgênica BR-16 RR**. Londrina: CNPSo, 1999. p. 132-133. Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 1999. (Embrapa Soja, Documentos, 142).

GUENZI, W.D.; McCALLA, T.M. Phytotoxic substances extracted from soil. **Soil Science of Society American Proceedings**, v. 30, p. 214-216, 1966.

HARRISON, L.A; BAILEY, M.R.; NAYLOR, M.; REAM, J.; HAMMOND, D.L. The expressed protein in synthase in glyphosate-tolerant soybeans, 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase from *Agrobacterium sp.* Strain CP4, is rapidly digested and is not toxic to mice upon acute gavage administration. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 756-761, 1996.

HERRIG, V.; FERRARESE, M.L.L.; SUZUKI, L.S., RODRIGUES, J.D.; FERRARESE-FILHO, O. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. **Biological Research**, v. 35, p. 51-58, 2002

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

ISHII, T. Structure and function of feruloylated polysaccharides. **Plant Science**, v. 127, p. 111-127, 1997.

KUITERS, A.T. Role of phenolic substances from decomposing forest litter in plant-soil interactions. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 39, p. 329-348, 1990

LODHI, M.A.K. Role of allelopathy as expressed by dominating trees in a lowland forest in controlling productivity and pattern of herbaceous growth. **American Journal of Botany**, v. 63, p. 1-8, 1976.

LYU, S-W.; BLUM, U. Effects of ferulic acid, an allelopathic compound, on net P, K, and water uptake by cucumber seedlings in a split-root system. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 2429-2439, 1990.

MARIN, S.R.; LUGLE, S.; PEDROSO, J.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; ARIAS, C.A.A.; FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.L. **Desenvolvimento de soja transgênica com genes de interesse ao melhoramento**. Londrina: EMBRAPA CNPSo, 2000. p. 42-44. Resultados de Pesquisa da EMBRAPA Soja 2000. Ecofisiologia e Biologia Molecular. (EMBRAPA Soja, Documentos, 164).

MENEZES, S.M.; TILLMANN, M.A.; DODE, L.B.; VILLELA, F.A. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 150-155, 2004.

MERSIE, W.; SINGH, M. Phenolic acids affect photosynthesis and protein synthesis by isolated leaf cells of velvet-leaf. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 1293-1301, 1993.

MIRANDA, D.M.; TILLMANN, M.A.A.; BALERINI, F.; VILLELA, F.A. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 93-103, 2005.

NG, P.L.L.; FERRARESE, M.L.L.; HUBNER, D.A.; RAVAGNANI, A.L.S.; FERRARESE-FILHO, O. Canola (*Brassica napus* L.) seed germination influenced by cinnamic and benzoic acids and derivatives: effects on peroxidase. **Seed Science and Technology**, v. 31, p. 39-46, 2003.

PADGETTE, S. R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.D.; RE, B.; La VALLEE, B.J.; TINIUUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTAZ, D.A.; PESCHKE, W.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B. Development, identification and characterization of a glyphosate tolerant soybean line. **Crop Science**, v. 35, p. 1451-1461, 1995.

PATTERSON, D.T. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max* L.). **Weed Science**, v. 29, p. 53-59, 1981.

POLITYCKA, B. Ethylene-dependent activity of phenylalanine ammonia-lyase and lignin formation in cucumber roots exposed to phenolic allelochemicals. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 68, p. 123-127, 1999.

POLITYCKA, B. Free and glucosylated phenolics, phenol- β -glucosyltransferase activity and membrane permeability in cucumber roots as affected by derivatives of cinnamic and benzoic acids. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 19, p. 311-317, 1997.

POLITYCKA, B. Peroxydase activity and peroxidation lipidic in roots of cucumber seedlings influenced by derivatives of cinnamic and benzoic acids. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 18, p. 365-370, 1996.

POLITYCKA, B. Phenolics and the activities of phenylalanine ammonia-lyase, phenol- β -glucosyltransferase and β -glucosidase in cucumber roots as affected by phenolic allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 20, p. 405-410, 1998.

RODRIGUES, B.N.; PASSINI, T.; FERREIRA, A.G. Research on allelopathy in Brazil. In: NARVAL, S.S. (Ed.). **Allelopathy update**. Enfield, Science Publication. 1999. p.307-323.

SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.L.; FINGER, A.; TEIXEIRA, A.C.N.; FERRARESE-FILHO, O. Lignification and related enzymes in soybean root growth-inhibition by ferulic acid. **Plant Biology**, v. 30, p. 1199-1208, 2004.

SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.L.; MOURÃO, K.S.M.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; BÖHM, F.M.L.Z.; FERRARESE-FILHO, O. Alterações anatômicas de raízes de soja cultivadas com ácido ferúlico. X CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, Recife, 2005. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2005. CD-ROM.

SHAH, D.M.; HORSCH, R.B.; KLEE, H.J.; KISHORE, G.M.; WINTER, J.A.; TUMER, N.E.; HIRONAKA, C.M.; SANDERS, P.R.; GASSER, C.S.; AYKENT, S.; SIEGEL, N.R.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. **Science**, v. 233, p. 78-81, 1986.

SHANN, J.R.; BLUM, U. The utilization of exogenously supplied ferulic acid in lignin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2977-2981, 1987.

SMITH, B.G.; HARRIS, P.J. Ferulic acid is esterified to glucuronarabinoxylans in pineapple cell walls. **Phytochemistry**, v. 56, p. 513-519. 2000.

SUZUKI, L.S.; HERRIG, V.; FERRARESE, M.L.L.; RODRIGUES, J.D.; FERRARESE-FILHO, O. Simultaneous effects of ferulic and vanillic acids on peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in soybean (*Glycine max*) roots. **Phyton**, v. 43, n. 1, p. 179-185. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3^a ed. São Paulo: Artmed, 2004. 719 p.

VAUGHAN, D.; ORD, B. Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*. **Journal of Science Food and Agricultural**, v. 52, p. 289-299, 1990.

VOLL, E. Efeitos da interação de ácido ferúlico e glifosate em soja. **Planta Daninha**, v. 11, n. 1 e 2, p. 5-8, 1993.

VON PINHO, E.V.R. Identificação de cultivares de soja modificada geneticamente através de marcadores morfológicos e moleculares. II CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA E MERCOSOJA 2002, Foz do Iguaçu, 2002. **Anais...** Londrina: EMBRAPA, 2002. p. 17-23.

WHITEHEAD, D.C. Identification of *p*-hydroxybenzoic, vanillic, *p*-coumaric and ferulic acids in soils. **Nature**, v. 202, p. 417-418, 1964.

ZONETTI, P.C. **Teores de lignina e crescimento de raízes de soja convencional e transgênica, resistente ao glifosato, em resposta à mudança de temperatura.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2007. 79pp. Tese (Doutorado em Agronomia).

APÊNDICE

Tabela 1A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação de lignina do tegumento das sementes das variedades CD-201 e CD-214RR.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
var	1	0.019013	0.019013	2.449
0.1686				
erro	6	0.046575	0.007763	
Total corrigido	7	0.065588		
CV (%) =	3.42			
Média geral:	2.5762500	Número de observações:		8

Tabela 2A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do teor de fenóis totais do tegumento das sementes das variedades CD-201 e CD-214RR.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
var	1	0.679778	0.679778	10.471
0.0178				
erro	6	0.389524	0.064921	
Total corrigido	7	1.069302		
CV (%) =	9.62			
Média geral:	2.6485000	Número de observações:		8

Tabela 3A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do crescimento das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em quatro tempos de incubação, com ou sem ácido ferúlico 1 mM.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
tempo	3	163.426063	54.475354	246.547
0.0000				
var	1	1.512900	1.512900	6.847
0.0118				
trat	1	211.557025	211.557025	957.475
0.0000				
tempo*var	3	0.861237	0.287079	1.299
0.2855				
tempo*trat	3	38.022363	12.674121	57.361
0.0000				
var*trat	1	1.562500	1.562500	7.072
0.0106				
tempo*var*trat	3	0.271737	0.090579	0.410
0.7465				
erro	48	10.605750	0.220953	
Total corrigido	63	427.819575		
CV (%) =	11.82			
Média geral:	3.9781250	Número de observações:	64	

Tabela 4A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação da biomassa fresca das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em quatro tempos de incubação, com ou sem ácido ferúlico 1 mM.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
tempo	3	0.217299	0.072433	67.196
0.0000				
var	1	0.02129	0.002129	1.975
0.1664				
trat	1	0.068873	0.068873	63.893
0.0000				
tempo*var	3	0.002552	0.000851	0.789
0.5059				
tempo*trat	3	0.019395	0.006465	5.998
0.0015				
var*trat	1	0.000274	0.000274	0.254
0.6162				
tempo*var*trat	3	0.003758	0.001253	1.162
0.3339				
erro	48	0.051741	0.001078	
Total corrigido	63	0.366022		
CV (%) =	18.85			
Média geral:	0.1742078	Número de observações:	64	

Tabela 5A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação da biomassa seca das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em quatro tempos de incubação, com ou sem ácido ferúlico 1 mM.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
tempo	3	0.000490	0.000163	32.935
0.0000				
var	1	0.000007	0.000007	1.485
0.2289				
trat	1	0.000088	0.000088	17.709
0.0001				
tempo*var	3	0.000012	0.000004	0.782
0.5101				
tempo*trat	3	0.000019	0.000006	1.276
0.2931				
var*trat	1	0.000001	0.000001	0.301
0.5857				
tempo*var*trat	3	0.000014	0.000005	0.918
0.4393				
erro	48	0.000238	0.000005	
Total corrigido	63	0.000870		
CV (%) =	20.84			
Média geral:	0.0106891	Número de observações:	64	

Tabela 6A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do teor de lignina das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em quatro tempos de incubação, com ou sem ácido ferúlico 1 mM.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
tempo	3	1484.379387	494.793129	195.963
0.0000				
var	1	2.932656	2.932656	1.161
0.2865				
trat	1	306.162506	306.162506	121.256
0.0000				
tempo*var	3	10.985381	3.661794	1.450
0.2399				
tempo*trat	3	105.372506	35.124169	13.911
0.0000				
var*trat	1	0.883600	0.883600	0.350
0.5569				
tempo*var*trat	3	1.225738	0.408579	0.162
0.9217				
erro	48	121.196800	2.524933	
Total corrigido	63	2033.138575		
CV (%) =	8.73			
Média geral:	18.1943750	Número de observações:	64	

Tabela 7A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do crescimento das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em 48 horas de incubação em solução nutritiva, com ou sem tratamento com glifosato, ácido ferúlico ou ácido ferúlico simultaneamente com glifosato.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
var	1	13.846953	13.846953	104.247
0.0000				
trat	3	69.530059	23.176686	174.486
0.0000				
var*trat	3	18.546909	6.182303	46.544
0.0000				
erro	24	3.187875	0.132828	
Total corrigido	31	105.111797		
CV (%) =	12.85			
Média geral:	2.8353125	Número de observações:	32	

Tabela 8A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação da biomassa fresca das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em 48 horas de incubação em solução nutritiva, com ou sem tratamento com glifosato, ácido ferúlico ou ácido ferúlico simultaneamente com glifosato.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
var	1	0.003063	0.003063	8.173
0.0087				
trat	3	0.029687	0.009896	26.402
0.0000				
var*trat	3	0.001801	0.000600	1.601
0.2152				
erro	24	0.008996	0.000375	
Total corrigido	31	0.043547		
CV (%) =	15.47			
Média geral:	0.1251781	Número de observações:	32	

Tabela 9A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação da biomassa seca das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em 48 horas de incubação em solução nutritiva, com ou sem tratamento com glifosato, ácido ferúlico ou ácido ferúlico simultaneamente com glifosato.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
var	1	0.000009	0.000009	5.615
0.0262				
trat	3	0.000088	0.000029	18.973
0.0000				
var*trat	3	0.000004	0.000001	0.911
0.4502				
erro	24	0.000037	0.000002	
Total corrigido	31	0.000138		
CV (%) =	15.36			
Média geral:	0.0080906	Número de observações:	32	

Tabela 10A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do teor de lignina das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em 48 horas de incubação em solução nutritiva, com ou sem tratamento com glifosato, ácido ferúlico ou ácido ferúlico simultaneamente com glifosato.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
var	1	38.588113	38.588113	61.157
0.0000				
trat	3	56.827413	18.942471	30.021
0.0000				
var*trat	3	12.780712	4.260237	6.752
0.0018				
erro	24	15.143350	0.630973	
Total corrigido	31	123.339588		
CV (%) =	4.96			
Média geral:	16.0156250	Número de observações:	32	

Tabela 11A – Análise de variância dos dados obtidos no experimento de determinação do teor de fenóis totais das raízes das variedades CD-201 e CD-214RR, em 48 horas de incubação em solução nutritiva, com ou sem tratamento com glifosato, ácido ferúlico ou ácido ferúlico simultaneamente com glifosato.

FV	GL	SQ	QM	Fc
Pr>Fc				
var	1	0.007812	0.007812	0.155
0.6968				
trat	3	4.481500	1.493833	29.758
0.0000				
var*trat	3	0.506638	0.168879	3.361
0.0353				
erro	24	1.206000	0.050250	
Total corrigido	31	6.201950		
CV (%) =	4.49			
Média geral:	4.9912500	Número de observações:		32

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)