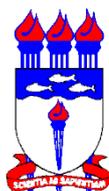


RENAN CANTALICE DE SOUZA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE *Emilia*  
*coccinea* (Sims) F. Don E *Digitaria horizontalis* Willd.  
SUBMETIDAS À MISTURA DE CLOMAZONE+AMETRINA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA –  
PRODUÇÃO VEGETAL E PROTEÇÃO DE PLANTAS  
RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS  
2009



RENAN CANTALICE DE SOUZA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE *Emilia  
coccinea* (Sims) F. Don E *Digitaria horizontalis* Willd.  
SUBMETIDAS À MISTURA DE CLOMAZONE+AMETRINA

**Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de  
de Pós-graduação em Agronomia–Produção vegetal  
do Centro de Ciências Agrárias da Universidade  
Federal de Alagoas, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área  
de Concentração Produção Vegetal.**

Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vilma Marques Ferreira

RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS  
2009

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Betânia Almeida dos Santos**

S726a Souza, Renan Cantalice de.  
Aspectos fisiológicos e bioquímicos de *Emilia coccínea* (Sims) F. Don e *Digitaria horizontalis* Willd. submetidas à mistura de clomazone + ametrina / Renan Cantalice de Souza, 2009.  
xii, 48 f. : il. tabs., graf.

Orientadora: Vilma Marques Ferreira.  
Dissertação (mestrado em Agronomia :Produção vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2009.

Bibliografia: f. 43-48.

1. Fluorescência da clorofila. 2. Clorofila. 3. Carotenóides. 4. Plantas – Tolerância a herbicidas. 5. Plantas daninhas. 6. Plantas – Estresse oxidativo. I. Título.

CDU: 632.5

## TERMO DE APROVAÇÃO

**RENAN CANTALICE DE SOUZA  
0910M01**

### **ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE *Emilia coccinea* (Sims) F. Don E *Digitaria horizontalis* Willd. SUBMETIDAS À MISTURA DE CLOMAZONE+AMETRINA**

Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.



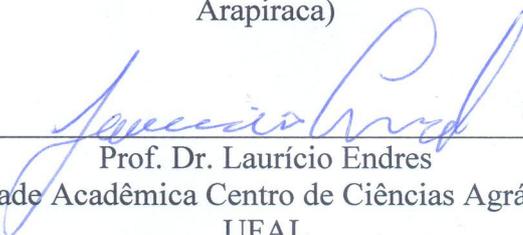
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Vilma Marques Ferreira  
Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias – UFAL  
Orientadora



Prof. Dr. Ronaldo do Nascimento  
Universidade Federal de Campina Grande- UFCG



Prof. Dr. José Vieira Silva  
Universidade Federal de Alagoas – UFAL (Campus  
Arapiraca)



Prof. Dr. Laurício Endres  
Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias –  
UFAL

**Aprovado com Distinção e Louvor em 17 de Dezembro de 2009.**

*A Deus, criador dos céus e da Terra em quem tenho sustento todos os dias e que a cada dia descubro o quão bela é a sua criação...*

*À minha esposa linda, Gleice de Oliveira Vicente Cantalice, pelo amor e apoio incondicional nessa caminhada científica que escolhi e por me proporcionar momentos inesquecíveis durante toda nossa união, te amo...*

*Aos meus pais José Leonaldo e Neci Araújo, pelo amor, cuidado, incentivo e educação durante toda minha vida, vocês são os melhores pais do mundo...*

*Aos meus irmãos Heloisa e Victor pelo companheirismo de sempre ...*

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

*À Universidade Federal de Alagoas (UFAL) pela oportunidade da realização do curso de mestrado.*

*À Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias (CECA) da UFAL pela possibilidade do ingresso no curso de pós-graduação em produção vegetal.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vilma Marques Ferreira pela orientação e pelos ensinamentos durante toda a minha vida acadêmica e profissional.*

*Aos companheiros de laboratório Débora Teresa, Eduardo Rebelo, Valtair Veríssimo, Tadeu Patêlo, Weverton Góes, Polyana da Silva, Cícero Teixeira, Humberto Cristiano, Hermeson Vitorino, Antonio, Manoel Victor, Laís, Israel Mariano, Felipe, Clenio e Romel pela ajuda na realização dos experimentos e análises laboratoriais, além dos momentos de descontração.*

*Aos colegas de mestrado Ricardo Araújo Ferreira Júnior, Tiago Tibola, Pedro Bento, Sihélio Júlio, Silvia Saniele e aos demais por compartilhar as lutas nas disciplinas.*

*Aos Professores Paulo Vanderlei Ferreira, Mauro Wagner, Cícero Carlos, Laurício Endres, José Vieira, João Araújo Neto, Iracilda e Leila pela contribuição no mestrado.*

*Ao professor Geraldo Veríssimo pela ajuda no tratamento estatístico dos dados.*

*Às Usinas Coruripe e Caeté-Unidade Cachoeira pela contribuição na obtenção das sementes das espécies estudadas.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa durante todo o curso.*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. PLANTAS DANINHAS E OS IMPACTOS NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR .....	3
2.2. <i>EMILIA COCCINEA</i> (SIMS) F.DON E <i>DIGITARIA HORIZONTALIS</i> WILLD .....	4
2.3. CONTROLE QUÍMICO DE PLANTAS DANINHAS NA CANA-DE-AÇÚCAR .....	5
2.3.1 <i>Inibidores do fotossistema II (FSII)</i> .....	6
2.3.2 <i>Inibidores da síntese de pigmentos</i> .....	6
2.4 TOLERÂNCIA DE PLANTAS DANINHAS À HERBICIDAS .....	7
2.5 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A .....	8
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	11
2.6.1 <i>Superóxido Dismutase (SOD)</i> .....	14
2.6.2 <i>Ascorbato peroxidase (APX)</i> .....	14
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1. INSTALAÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	16
3.2 VARIÁVEIS ANALISADAS .....	18
3.2.1 <i>Emissões de fluorescência da clorofila a</i> .....	19
3.2.2 <i>Determinações dos teores de pigmentos fotossintéticos</i> .....	19
3.2.3 <i>Proteínas solúveis</i> .....	20
3.2.4 <i>Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)</i> .....	20
3.2.5 <i>Atividade da Ascorbato peroxidase (APX)</i> .....	21
3.2.6 <i>Extravasamento de eletrólitos</i> .....	21
3.2.7 <i>Peroxidação de Lipídeos</i> .....	22
3.2.8 <i>Área foliar, matéria seca e mortalidade das plantas</i> .....	23
3.3. DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	23
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
4.1 TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS.....	24
4.2 EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA .....	27
4.3 PROTEÍNAS SOLÚVEIS .....	31
4.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	33
4.5 EXTRAVASAMENTO DE ELETRÓLITOS E PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS .....	36
4.6 ÁREA FOLIAR, MATÉRIA SECA E MORTALIDADE DAS PLANTAS .....	38
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>42</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Análise química do substrato utilizado nos experimentos com as espécies *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* submetidas a diferentes doses da mistura de clomazone+ametrina. .... 17
- Tabela 2. Média dos teores de pigmentos fotossintéticos de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância..... 24
- Tabela 3. Média dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância..... 28
- Tabela 4. Média dos teores de proteínas solúveis de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância..... 31
- Tabela 5. Média das atividades das enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância. ... 33
- Tabela 6. Média do extravasamento de eletrólitos e conteúdo de malonilaldeído (MDA) de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância. .... 36
- Tabela 7. Média da área foliar e da matéria seca de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância..... 38
- Tabela 8. Média dos percentuais de plantas vivas e mortas de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* 25 dias após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina, com o resultado do teste do  $\chi^2$ . .... 41

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Seqüência de uma curva típica de fluorescência. Fo- fluorescência inicial; Fm- fluorescência máxima; Fv- fluorescência variável; Fp- pico inicial após luz actínea de  $680 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; F'- Fluorescência em equilíbrio; Fm'- fluorescência máxima sob luz; Fv'- fluorescência variável de folhas iluminadas;  $Fq' = Fm' - F'$ . ..... 10
- Figura 2. Geração de diferentes EROs pela transferência de energia ou redução univalente seqüencial do oxigênio no estado basal tripleto. .... 11
- Figura 3 Vias de Limpeza de EROs nas plantas. a) o ciclo água-água; b) o ciclo ascorbato-glutationa; c) o ciclo glutaciona peroxidase e d) catalase. PSI= fotossistema I;  $\text{O}_2^-$  = radical superóxido; Fd= ferredoxina; AsA= ascorbato; MDA= monodehidroascorbato;  $\text{H}_2\text{O}$ = água; SOD= superóxido dismutase; APX= ascorbato peroxidase; MDAR= monodehidroascorbato redutase; NADPH= fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reduzido; NADP+= fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; DHA= dehidroascorbato; DHAR= dehidroascorbato redutase; GSSG= glutaciona oxidada; GSH= glutaciona reduzida; GR= glutaciona redutase; GPX= glutaciona peroxidase; CAT= catalase. .... 13
- Figura 4. Reação catalisada pela superóxido dismutase. .... 14
- Figura 5. Reação catalisada pela ascorbato peroxidase. .... 14
- Figura 6. Aplicação da mistura de clomazone+ametrina em plantas de *Emilia coccinea*, trinta dias após semeadura. .... 18
- Figura 7. Teores de clorofila total de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida. .... 25
- Figura 8. Teores de carotenóides de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida. .... 25

Figura 9. Sintomas visuais da mistura de clomazone+ametrina após 72 horas da aplicação em <i>Emilia coccinea</i> . Onde a,b,c e d são respectivamente as doses de 0; 2,5; 5; e 10 L.ha <sup>-1</sup> .	26
Figura 10 Sintomas da mistura de clomazone+ametrina após 72 horas da aplicação em <i>Digitaria horizontalis</i> . Onde a,b,c e d são respectivamente as doses de 0; 2,5; 5 e 10 L ha <sup>-1</sup> .	26
Figura 11. Rendimento quântico máximo do FSII de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às leituras realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.	29
Figura 12. Rendimento quântico efetivo do FSII de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às leituras realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.	29
Figura 13. Fluorescência máxima de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às leituras realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.	30
Figura 14. Fluorescência inicial de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às leituras realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.	30
Figura 15. Proteínas solúveis de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida. ....	32
Figura 16. Atividade da superóxido dismutase (SOD) de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.	34
Figura 17. Atividade da ascorbato peroxidase (APX) de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina.	

Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.....	35
Figura 18. Extravasamento de eletrólitos de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida. ....	37
Figura 19. Peroxidação de lipídios de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida. ....	38
Figura 20. Área foliar de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) 72 horas após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. ....	40
Figura 21. Matéria seca de <i>Emilia coccinea</i> (A) e <i>Digitaria horizontalis</i> (B) 25 dias após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. ....	40

## RESUMO

O objetivo da pesquisa foi verificar diferenças fisiológicas entre mono (*Digitaria horizontalis*) e dicotiledôneas (*Emilia coccinea*) em função da aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina e sua relação com a mortalidade dessas espécies. Para isso, foram realizados dois experimentos, um para cada espécie, onde aplicou-se a mistura de herbicidas clomazone e ametrina, em quatro doses: 0 (água); 2,5 L. ha<sup>-1</sup> (0,5 kg i.a ha<sup>-1</sup> de clomazone + 0,75 kg i.a ha<sup>-1</sup> de ametrina) ; 5 L. ha<sup>-1</sup> ( 1 kg i.a ha<sup>-1</sup> de clomazone + 1,5 kg i.a ha<sup>-1</sup> de ametrina) e 10 L. ha<sup>-1</sup> (2 kg i.a ha<sup>-1</sup> de clomazone + 3 kg i.a ha<sup>-1</sup> de ametrina), aos 30 dias após a semeadura. As variáveis fisiológicas estudadas foram: teores de pigmentos fotossintéticos, emissão da fluorescência da clorofila a, proteínas solúveis, atividade da superóxido dismutase (SOD), atividade da ascorbato peroxidase (APX), extravasamento de eletrólitos e peroxidação de lipídeos 72 horas após a aplicação. Após 25 dias da aplicação foi contabilizada a frequência de plantas mortas e a matéria seca acumulada por planta. Os dados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão exponencial ou linear. Os teores clorofila totais e carotenóides decresceram exponencialmente com o aumento das doses da mistura de herbicidas, nas duas espécies estudadas. Os valores do rendimento quântico potencial (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo (YIELD) e fluorescência máxima (Fm) também decresceram exponencialmente para as duas espécies, já a fluorescência inicial (Fo) decresceu linearmente para ambas. A atividade da SOD decresceu linearmente em ambas as espécies, porém esse decréscimo foi mais acentuado na monocotiledônea. Não houve alteração significativa da atividade da APX. A dicotiledônea apresentou aumento linear mais acentuado no extravasamento de eletrólitos comparado com a monocotiledônea. Para a peroxidação de lipídios, as espécies apresentaram comportamento semelhante aos de extravasamento de eletrólitos. Em relação à mortalidade das plantas, a dose de 10 L.ha<sup>-1</sup> eliminou apenas 53,84% da população de *D. horizontalis* enquanto a mesma dose eliminou 100% da população de *E. coccinea*. Diante das observações, conclui-se que a espécie que sofreu maior dano de membranas celulares foi a que obteve maior redução na matéria seca por planta e maior percentual de mortalidade. Outros mecanismos que não os avaliados nessa pesquisa podem estar relacionados com a maior tolerância de *D. horizontalis* à mistura de ametrina+clomazone.

**Palavras-chave:** fluorescência da clorofila, clorofila, carotenóides, tolerância a herbicidas, plantas daninhas e estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Purpose of this research was to investigate physiological differences between monocots (*Digitaria horizontalis*) and dicots (*Emilia coccinea*) in function on the application of the mixture of herbicides clomazone + ametryn and its relation with mortality of these species. For this, conducted two experiments, one for each species, where was applied the herbicide mixture in four doses: 0 (water); 2.5 L. ha<sup>-1</sup> (0.5 kg a.i ha<sup>-1</sup> of clomazone + 0.75 kg a.i.ha<sup>-1</sup> of ametrina) ; 5 L. ha<sup>-1</sup> ( 1 kg a.i ha<sup>-1</sup> of clomazone + 1.5 kg a.i ha<sup>-1</sup> of ametrina) e 10 L. ha<sup>-1</sup> (2 kg a.i ha<sup>-1</sup> of clomazone + 3 kg a.i ha<sup>-1</sup> of ametrina), when the plants were 30 days after sowing. Physiological variables studied were levels of photosynthetic pigments, chlorophyll fluorescence emission, superoxide dismutase (SOD) activity, ascorbate peroxidase (APX) activity, electrolyte leakage and lipid peroxidation 72 hours after the application. After 25 days of the application were counted the frequency of dead plants and dry matter accumulation per plant. The data were submitted to analysis of variance and exponential or linear regression analysis. The total chlorophyll and carotenoids decreased exponentially with increasing doses of the mixture in the two species studied. The values of maximum fluorescence (Fm), maximum quantum yield (Fv/Fm) and effective quantum yield (YIELD) also decreased exponentially for both species, since the minimal fluorescence (Fo) decreased linearly for both. The SOD activity decreased linearly in both species, but this decrease was more pronounced in monocots. The APX showed no significant change in its activity. The dicots showed a linear increase more pronounced in electrolyte leakage compared with the monocot. For lipid peroxidation, the species were similar to those electrolyte leakage. In relation to plant mortality, the dose of 10 L.ha<sup>-1</sup> eliminated only 53.84% of the population of *D. horizontalis* while the same dose for *E. coccinea* eliminated 100% of the population. Given the observations, concluded that the species that suffered the greatest damage of the cell membrane was obtained more reduction in dry matter per plant and a higher percentage of mortality. And other mechanisms than those evaluated in this study may be related to increased tolerance of *D. horizontalis* to mixture of ametryn+clomazone.

**Keywords:** chlorophyll fluorescence, chlorophyll, carotenoids, herbicide tolerance, weed and oxidative stress.

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas daninhas são um dos principais fatores bióticos que interferem no desenvolvimento dos cultivos em geral, e, especificamente da cana-de-açúcar, cultura de grande expressão econômica e de valor estratégico para o Brasil e para o estado de Alagoas devido à produção de açúcar e álcool, além da co-geração de energia elétrica. Nesse agroecossistema, tais plantas competem por água, luz, CO<sub>2</sub>, nutrientes, podendo também apresentar efeitos alelopáticos sobre a cultura (KUYA et al., 2003).

Em uma comunidade de plantas infestantes existem espécies mono e dicotiledôneas que devem ser controladas para evitar a competição e os consequentes danos à cultura. O controle químico, através do emprego de herbicidas, é o principal e mais eficiente método de controle de plantas daninhas. Atribui-se o sucesso de aceitação deste método pelos produtores à menor dependência de mão-de-obra e alta eficiência mesmo em épocas chuvosas (SILVA et al, 2007).

A atividade biológica de um herbicida está associada à sua absorção, translocação, metabolização e sensibilidade da planta. Assim a tolerância a diferentes doses de herbicidas é o resultado de variações nos processos citados (WARWICK, 1991). Dessa forma, as espécies mono e dicotiledôneas podem apresentar respostas diferentes à aplicação de um herbicida.

A utilização de misturas de herbicidas tem aumentado, com a finalidade de manejar e prevenir a tolerância e/ou resistência de plantas daninhas. Visto que a aplicação de um mesmo ingrediente ativo por vários anos consecutivos aumenta a pressão de seleção de indivíduos tolerantes e resistentes em uma população de plantas daninhas (CHRISTOFFOLETI et al., 2009). Dentre essas misturas destaca-se a associação de moléculas que interferem no fluxo de elétrons entre os fotossistemas (a exemplo da ametrina) com moléculas inibidoras da síntese de pigmentos fotossintéticos (clomazone).

A ametrina é um inibidor do fluxo de elétrons no fotossistema II (FSII), bloqueando a transferência de elétrons do doador de elétrons, Q<sub>A</sub>, para o carreador móvel de elétron, Q<sub>B</sub> (HOLT et al., 1993). O clomazone é um herbicida pertencente ao grupo dos inibidores de pigmentos, bloqueando a formação de isoprenóides cloroplastídicos incluindo pigmentos fotossintéticos, carotenóides, carreadores de elétrons e tocoferol em plantas superiores (NORMAN et al., 1990).

Os herbicidas também podem levar as plantas, a aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses radicais podem reagir com várias macromoléculas de

importância biológica como lipídeos de membranas, proteínas e DNA, causando sérios danos, podendo levar à morte dos tecidos. O monitoramento da atividade das enzimas que catalizam a remoção desses compostos pode revelar o nível de estresse em que o vegetal se encontra (MITTLER, 2002).

Alterações no funcionamento do aparato fotossintético em condições de campo e em laboratório podem ser detectadas através de mudanças dos padrões da emissão de fluorescência da clorofila a (MAXWELL & JOHNSON, 2000; BAKER & ROSENQVIST, 2004). A clorofila é a molécula responsável pela captação da energia luminosa, que irá ser convertida em carboidratos (TAIZ & ZEIGER, 2009), dessa forma alterações na síntese de tal pigmento podem ocasionar distúrbios no desenvolvimento vegetal. Além disso, os carotenóides desempenham papel na proteção da planta contra os efeitos nocivos do excesso de radiação (HAVAUX & NIYOGI, 1999), assim um decréscimo em sua biossíntese poderá causar danos às plantas.

O melhor entendimento das diferenças fisiológicas entre monocotiledôneas e dicotiledôneas frente à aplicação de herbicidas pode ser útil para otimizar o uso dessa ferramenta na agricultura. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi verificar diferenças na fisiologia das espécies de plantas daninhas *Digitaria horizontalis* (monocotiledônea) e *Emilia coccinea* (dicotiledônea), ambas infestantes da cultura da cana-de-açúcar, em resposta à aplicação de diferentes doses da mistura de herbicidas clomazone + ametrina.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Plantas daninhas e os impactos na cultura da cana-de-açúcar

As plantas daninhas no agroecossistema da cana-de-açúcar representam um dos maiores fatores bióticos de interferência do crescimento e desenvolvimento, limitando a produtividade dessa cultura (KUVA et al., 2003). Embora a cana-de-açúcar apresente o metabolismo fotossintético  $C_4$ , sendo esse altamente produtivo sob condições tropicais, deve-se ter atenção quanto à competição com as plantas invasoras, principalmente nos estágios iniciais do estabelecimento da cultura, pois a brotação e o crescimento inicial são lentos além, de várias espécies daninhas também apresentarem o metabolismo  $C_4$  (PROCÓPIO et al., 2003).

A interferência pode ser definida como um conjunto de ações que a cultura recebe das plantas daninhas, resultando em respostas diretas ou indiretas. A interferência direta mais conhecida é a competição das plantas daninhas com a cana-de-açúcar pelos nutrientes minerais essenciais, a luz, a água e o espaço. A alelopatia é outra forma de interferência direta, onde as plantas daninhas produzem compostos químicos que podem reduzir ou inibir o crescimento dos cultivos. Além desses, o parasitismo pode ser considerado de importância em cana-de-açúcar. Dentre as interferências indiretas estão: hospedar pragas e doenças as culturas, além de dificultar as colheitas (PITELLI, 1987).

De acordo com Sign & Kaur (2003) a alta competição, nos estágios iniciais de crescimento entre 3 e 4 meses, causa reduções substanciais no rendimento, e em último caso reduz a rentabilidade dos cultivos em longo prazo onde as perdas de produtividade variam de 20 a 40%. Kuva et al., (2001) estudando a competição específica e permanente de *Brachiaria decumbens*, encontraram que esta reduz em 82% a produtividade do cultivo de cana-de-açúcar. Por isso a adoção de medidas que interfiram no crescimento e controlem o desenvolvimento de plantas daninhas devem ocorrer dentro de um período crítico para que não ocorram danos à cultura e nem prejudiquem o ambiente (SILVA et al., 2007).

Nesse contexto Pitelli & Durigan (1984) definiram período total de prevenção da interferência (PTPI) como o tempo em que a cultura deve ser deixada livre de plantas invasoras, para que o rendimento não seja alterado tanto em sua qualidade como em sua quantidade, a partir da emergência ou plantio da cultura. Após esse o próprio sombreamento da cultura já bloqueia o desenvolvimento das invasoras. O período anterior

à interferência (PAI) é o tempo após a semeadura, em que a cultura pode conviver com a comunidade de plantas daninhas antes que a interferência se instale e reduza significativamente a produtividade. E o período crítico de prevenção da interferência (PCPI) pode ser descrito como o tempo em que a cultura deve ser mantida livre das infestantes até o ponto em que não prejudiquem mais o rendimento. Porém Vidal et al.(2005), leva em conta os aspectos rentabilidade, propondo assim a existência do período anterior ao dano no rendimento econômico (PADRE), o qual leva em consideração os custos com controle e os valores dos rendimentos da cultura para se determinar o período aceitável de interferência antes de se decidir pelo seu controle.

O nível do dano causado pelas espécies invasoras depende principalmente da capacidade de competição dessas, sendo assim varia entre as diferentes espécies. Por conta da extensão territorial do Brasil e do cultivo da cana-de-açúcar em praticamente todas as regiões, existe uma infinidade de espécies relatadas como infestantes dos canaviais.

Para se iniciar o manejo adequado das plantas daninhas deve-se levar em consideração a identificação das espécies ali presentes, assim como a importância com relação à frequência, dominância e densidade dessas (OLIVEIRA & FREITAS, 2008). Segundo Procópio et al. (2003) entre as espécies mais encontradas nos canaviais da região Centro-Sul estão: *Digitaria horizontalis* (capim-colchão), *Cyperus rotundus* (Tiririca), *Emilia sonchifolia* (falsa-serralha) entre outras. Além dessas, na região nordeste destacam-se: *Paspalum maritimum* (capim-gengibre) e *Chamaesyce hirta* (burra-leiteira).

## **2.2. *Emilia coccinea* (Sims) F.Don e *Digitaria horizontalis* Willd**

A espécie *Emilia coccinea* pertence à família Asteraceae, sendo conhecida como pincel, serralha-mirim e serralhinha. Trata-se de uma planta anual, herbácea que tem ocorrência em todo o litoral brasileiro, propagando-se apenas por sementes. É mais frequente em regiões de alta umidade relativa e infesta culturas anuais e perenes (LORENZI, 2000). Levantamentos fitossociológicos registram sua ocorrência em áreas de cultivo de cana-de-açúcar na região sudeste, principalmente em cana-planta (OLIVEIRA & FREITAS, 2008). No estado de Alagoas, embora não haja relatos oficiais, sabe-se que essa espécie ocorre com frequência nas áreas de cultivo comercial de cana-de-açúcar.

A espécie *Digitaria horizontalis* pertence à família Poaceae, sendo conhecida como capim-colchão, milha e capim-milhã. É uma planta anual, herbácea, ereta ou decumbente, muito entouceirada, infestando lavouras perenes e anuais. Propaga-se por sementes e por

enraizamento dos nós inferiores (LORENZI, 2006). É citada como uma das principais espécies de plantas daninhas que infestam os canaviais em todo o território brasileiro (DIAS et al., 2007). Sua importância como infestante vem crescendo nos últimos anos, principalmente pela seleção imposta por herbicidas que tem pouca eficiência em seu controle (PROCÓPIO et al., 2003).

### **2.3. Controle químico de plantas daninhas na cana-de-açúcar**

Existem basicamente cinco métodos de controle de plantas daninhas: i) o preventivo, no qual se utilizam práticas que visam prevenir a introdução ou disseminação de espécies-problema; ii) o cultural, com uso de rotação de cultura, cobertura verde e diferentes espaçamentos; iii) o mecânico, através de arranque manual, capinas e roçadas; iv) o físico, utilizando-se práticas de inundação, solarização e cobertura morta; v) o químico, com a utilização de herbicidas (SILVA et al., 2007a). Porém de longe, o químico, utilizando-se herbicidas, é o mais utilizado pelos produtores rurais em situação de pré-emergência ou pós-emergência inicial ou eventualmente em condições de pós-emergência tardia, em jato dirigido à entrelinha da cultura, com as plantas daninhas em estágio mais tardio de desenvolvimento (CHISTOFFOLETI et al, 2009).

Uma das formas utilizadas para classificar os herbicidas é quanto ao seu mecanismo de ação. O qual representa o ponto inicial do metabolismo das plantas, em que um ingrediente ativo atua , acarretando em uma série de respostas metabólicas sequenciais, resultando ou não em sintomas visuais (HOLT et al.,1993).

Segundo Procópio et al. (2003), os principais grupos de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar, divididos por mecanismo de ação, são: os reguladores de crescimento, inibidores da acetolactato sintetase (ALS), inibidores da 5-enolpiruvilchiquimato3-fosfato sintase (EPSP), inibidores do fotossistema II (FSII), inibidores de pigmentos, destruidores de membranas e inibidores de respiração.

### **2.3.1 Inibidores do fotossistema II**

Os herbicidas inibidores do fotossistema II (FSII) podem ser divididos em duas superfamílias: a família da uréia/triazina e a família dos fenólicos (HOLT et al., 1993). Os herbicidas da família das triazinas (atrazina, simazina e ametrina) e fenilurea (diuron), bloqueiam a transferência de elétrons do doador de elétron,  $Q_A$ , para o carreador móvel de elétron,  $Q_B$ . Eles fazem isso ligando-se ao sítio de ligação da plastoquinona (PQ) na proteína D1 do centro de reação do FSII. As moléculas que se ligam a proteína D1 e inibem o transporte de elétron, causam duas principais conseqüências: i) escassez de NADPH, que é requerido para a fase de redução do ciclo de Calvin; ii) formação de radicais livres ( $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ,  $Chl^3$ ) que causam a fotoxidação de moléculas importantes como: pigmentos, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, causando danos a membranas e inativação de enzimas, assim inviabilizando a célula. A outra família de inibidores fotossintéticos também se liga ao grupamento  $Q_B$ . Porém são chamados inibidores “não clássicos”, por considerar-se que a atuação dos fenóis sobre a fotossíntese constitua apenas um evento secundário na toxicidade desses herbicidas para as plantas (DEVINE & SHUKLA, 2000; ALLA et al, 2008a).

Os sintomas visuais apresentados por plantas suscetíveis aos inibidores do FSII incluem: cloroses internervais e nas bordas das folhas, progredindo para necrose. Outro fato é que esses aparecem primariamente em folhas mais velhas e podem ser confundidos com sintomas do grupo de moléculas disruptoras de membranas (PROCÓPIO et al., 2003).

### **2.3.2 Inibidores da síntese de pigmentos**

Os herbicidas inibidores da síntese de pigmentos incluem os grupos químicos das isoxazolidinona e piridazinonas. Com a inibição da produção de pigmentos fotossintéticos pelas plantas, particularmente os carotenóides, leva a um “branqueamento” ou ao desenvolvimento de uma coloração violácea das folhas. Qualquer um desses sintomas, deixa as invasoras mais suscetíveis ao dano oxidativo causado pela absorção da radiação ultravioleta (TENBROOK & TJEERDEMA, 2005) ou pela não dissipação do excesso de energia da clorofila no estado tripleto, antes da formação de espécies de oxigênio reativo que podem causar peroxidação lipídica nas membranas (MORTENSEN & SKIBSTED, 1997). Esses últimos causam necroses com o passar do tempo, levando a morte das plantas.

Dentre as diversas moléculas inibidoras de pigmentos existentes, o clomazone é um ingrediente ativo de grande uso na cultura da cana-de-açúcar. Bloqueando a formação de isoprenoídes cloroplastídicos incluindo pigmentos fotossintéticos, carotenóides, carreadores de elétrons e tocoferol em plantas superiores (NORMAN et al., 1990).

## 2.4 Tolerância de plantas daninhas à herbicidas

A habilidade das plantas tolerarem a um herbicida, seja essa planta daninha ou cultivada, é devido à capacidade diferencial na absorção, translocação, metabolização ou exsudação do composto para o ambiente. Além disso, o estágio de desenvolvimento e as condições climáticas antes e após aplicação, influenciam de forma substancial na tolerância das espécies aos herbicidas (GALON et al., 2009).

Basicamente os mecanismos que as plantas utilizam para tolerar e/ou resistir à uma molécula são os seguintes: menor absorção e/ou translocação, maior metabolização do herbicida em substâncias menos fitotóxicas, compartimentalização da molécula, falta de afinidade do herbicida pelo sítio de ação específico e superprodução da enzima-alvo (SILVA et al., 2007b).

A absorção diferencial por raízes e folhas geralmente está envolvida no mecanismo de tolerância de várias espécies aos herbicidas inibidores do FSII. Assim a taxa de absorção pode ser essencial para a tolerância de espécies daninhas aos herbicidas. Por conta disso os estádios de desenvolvimento das plantas e as condições climáticas podem ser preponderantes para a eficiência dos herbicidas (GALON et al., 2009). Entretanto, nem sempre a tolerância a um herbicida é determinada pela absorção e translocação diferencial, como o caso de *Digitaria nuda* aos herbicidas diuron e imazapyr (DIAS et al., 2004).

A translocação em baixos níveis também garante seletividade em certas espécies daninhas e cultivadas. O clomazone é seletivo a soja justamente pela menor translocação desse ingrediente nessa espécie em relação às suas invasoras (GALON et al., 2009; NORMAN et al., 1990).

Após a penetração do herbicida na planta, a molécula poderá ser metabolizada a compostos secundários sem atividade ou com atividade reduzida. Normalmente os mecanismos de desintoxicação de herbicidas incluem metabolismo enzimático e transformação desses compostos em substâncias menos tóxicas. Entre as enzimas pode-se citar a glutathione-S-transferase, que atua na conjugação de herbicidas e/ou moléculas

tóxicas com os peptídeos de glutathione inativando ou reduzindo a fitotoxidez de uma determinada molécula (EDWARDS et al., 2000).

Além disso, a planta pode utilizar enzimas para amenizar e/ou reverter os efeitos causados pelos herbicidas. Entre essas proteínas podem-se destacar as do sistema antioxidativo, as quais removem os radicais livres (oxigênio reativo) gerados por moléculas inibidoras do FSI e FSII (PYON et al., 2004; HASSAN & ALLA, 2005).

A aplicação de herbicidas por anos consecutivos em uma mesma área, sem a preocupação com a utilização de mais de um mecanismo de ação, gera uma pressão de seleção levando ao surgimento de altas densidades de plantas tolerantes. A tolerância diferenciada a determinada molécula, dentro de uma espécie é bastante comum (GALON et al., 2009).

Assim como em outros estresses, os herbicidas causam alterações no metabolismo das plantas que podem alterar os padrões de emissão de fluorescência da clorofila *a* (BAKER, 2008). Além disso, a atividade das enzimas antioxidantes pode ser utilizada como indicativo do bom funcionamento do metabolismo das plantas, já que diversas causas, como a aplicação de herbicidas podem levar a alta produção de radicais livres (APEL & HIRT, 2004; CARRILO & VALLE, 2005).

## **2.5 Fluorescência da clorofila *a***

As primeiras observações sobre as mudanças no rendimento da fluorescência da clorofila *a* foram feitas por Kautsky e colaboradores em 1960 (MAXWELL & JOHNSON, 2000). A luz absorvida pelas moléculas de clorofila, após mudarem a configuração eletrônica dessas, elevam a clorofila do estado basal (Chl *a*) para o estado excitado (Chl *a*\*). Conseqüentemente essas moléculas têm que dissipar a energia proveniente dos fótons, para voltar ao seu estado basal já que o estado excitado é instável, por três vias básicas: a primeira via é a dissipação fotoquímica, que consiste na utilização da energia luminosa nos processos fotoquímicos da fotossíntese, que culminarão com a formação de ATP e NADPH, para serem gastos durante a fase bioquímica do processo fotossintético. Essa “dissipação” também é conhecida como *quenching* fotoquímico ( $q_p$ ); a segunda via é a re-emissão de um fóton (radiação) em um comprimento de onda levemente mais longo (vermelho e vermelho distante), essa é conhecida como fluorescência; a terceira via é

produção de calor na forma de radiação infravermelha, essa é conhecida como *quenching* não-fotoquímico( $q_N$ ) (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Dessa forma, as três vias competem entre si, onde qualquer aumento na eficiência de uma resultará em decréscimo das outras. Assim medidas de fluorescência da clorofila *a*, podem gerar informações sobre mudanças ocorridas na eficiência fotoquímica e na dissipação de calor (MAXWELL & JOHNSON, 2000). A fluorescência da clorofila *a* em sua maior parte emitida pelo fotossistema II (FSII) e pelo sistema coletor de luz do FSII (LHCII), onde os estudos sobre essa emissão têm sido relacionados com respostas de fluorescência, quando um tecido fotossintetizante é rapidamente iluminado, após uma adaptação ao escuro (CAMPOSTRINI, 2001).

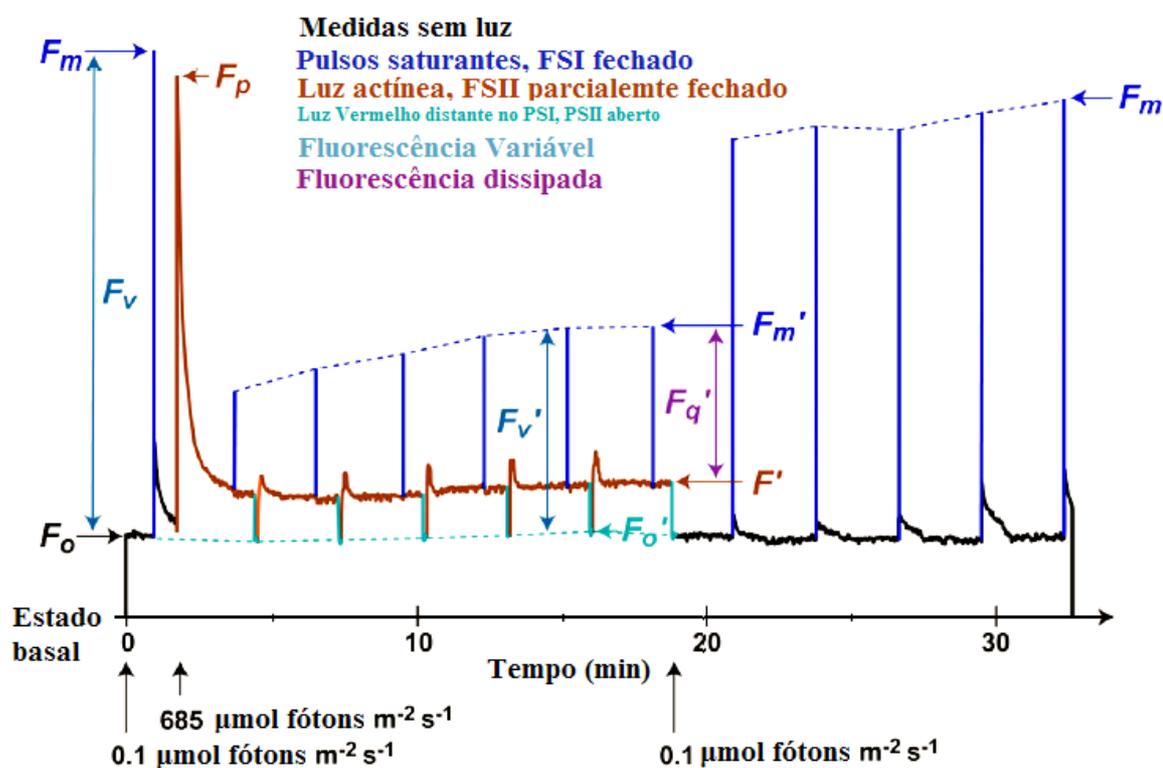
No escuro os centros de reações são ditos como “abertos”, pois a quinona A ( $Q_A$ ) está completamente oxidada, e assim são capazes de realizar a redução fotoquímica da  $Q_A$ . A exposição de uma folha adaptada ao escuro, a um feixe de luz de baixa intensidade ( $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) resulta no nível mínimo de fluorescência ( $F_o$ ) (Figura 1). O  $F_o$  representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofila *a* excitadas, antes de a energia ser dissipada para o centro de reação do FSII. Esse é um valor de referência para determinação de outros parâmetros da fluorescência, podendo ser alterado em casos onde existam mudanças estruturais nos pigmentos fotossintéticos do FSII (CAMPOSTRINI, 2001; BAKER, 2008).

Após atingir  $F_o$ , o tecido fotossintetizante pode ser exposto a um rápido pulso de luz actínica de alta intensidade (menos de 1s e muitos milhares de  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), onde a  $Q_A$  estará totalmente reduzida e seu nível de fluorescência máximo será alcançado ( $F_m$ ). Nesse ponto os centros de reação do FSII, com a  $Q_A$  estarão “fechados”. A diferença entre  $F_m$  e  $F_o$  é a fluorescência variável ( $F_v$ ). A razão  $F_v/F_m$  pode ser utilizada para estimar a eficiência quântica da redução da  $Q_A$ . Esse valor demonstra a eficiência máxima que a luz absorvida pelo complexo antena do FSII é convertida à energia química (redução da  $Q_A$ ) (BAKER & ROSENQVIST, 2000).

A fluorescência também pode ser medida com as folhas adaptadas à luz. Quando essa é exposta a uma luz saturante com alta densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), há um aumento da fluorescência até os níveis máximo  $F_m'$  (Figura 1). O  $F_o'$  é o nível mínimo de fluorescência, quando o tecido encontra-se adaptado à luz. A diferença entre  $F_m'$  e  $F_o'$  é a fluorescência variável sob condições de luz. Dessa forma a razão  $F_v'/F_m'$  é a eficiência quântica máxima do FSII e fornece uma estimativa da eficiência fotoquímica do FSII a uma dada intensidade de luz, o qual é a

eficiência operacional do FSII se todos os centros do FSII estiverem abertos ( $Q_A$  oxidada) (BAKER, 2008).

Então as medidas de fluorescência são uma importante ferramenta para os estudos de fisiologia de plantas, pois se trata de um método não destrutivo e de alta aplicabilidade em condições de campo e de laboratório. Diversos estresses e mudanças metabólicas podem alterar os padrões de emissão de fluorescência nas plantas, mas essa é principalmente afetada por causas que influenciem na fase fotoquímica da fotossíntese. Diversos autores apontam que os valores comuns de  $F_v/F_m$  em plantas não estressadas giram em torno de 0,8. O monitoramento desse parâmetro passa a ser então, uma rápida e simples maneira de verificar condições fisiológicas de plantas (BAKER, 2008; BAKER & ROSENQVIST, 2000).



**Figura 1.** Seq\u00eancia de uma curva t\u00edpica de fluoresc\u00eancia.  $F_o$ - fluoresc\u00eancia inicial;  $F_m$ - fluoresc\u00eancia m\u00e1xima;  $F_v$ - fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel;  $F_p$ - pico inicial ap\u00f3s luz act\u00ednea de  $680 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ;  $F'$ - Fluoresc\u00eancia em equil\u00edbrio;  $F_m'$ - fluoresc\u00eancia m\u00e1xima sob luz;  $F_v'$ - fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel de folhas iluminadas;  $F_q' = F_m' - F'$ .

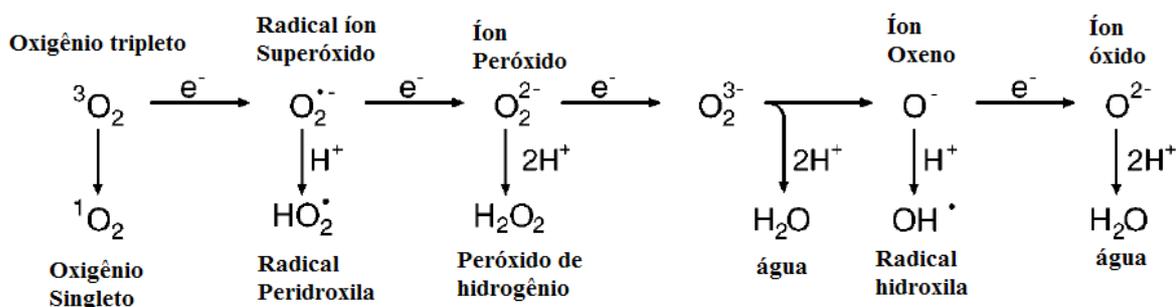
Barbagallo et al., (2003) estudando as imagens de fluoresc\u00eancia para a identifica\u00e7\u00e3o de perturba\u00e7\u00f5es metab\u00f3licas em um grande n\u00famero de plantas, mostraram que mesmo a aplica\u00e7\u00e3o de herbicidas que inibem a s\u00edntese de amino\u00e1cidos de cadeia ramificada (sem envolvimento direto com o transporte direto de el\u00e9trons fotossint\u00e9tico) decresceu os

valores de Fv/Fm, com o aumento das doses da molécula e que esse decréscimo foi observado sem a manifestação de nenhum sintoma visual. Assim a fluorescência pode identificar alterações metabólicas imperceptíveis ao olho humano.

## 2.6 Estresse oxidativo

A evolução dos processos metabólicos aeróbicos como a respiração e a fotossíntese, levam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Porém condições ambientais desfavoráveis como: excesso de radiação, seca, deficiência nutricional, baixas ou altas temperaturas, doenças, herbicidas e metais pesados podem ocasionar aumento na produção de EROs nas plantas (APEL & HIRT, 2004; CARRILO & VALLE, 2005).

O oxigênio molecular em seu estado basal encontra-se como tripleto: na camada de valência, os elétrons ocupam orbitais diferentes com spins paralelos. Isso faz com que  $O_2$  presente na natureza, apresente um fenômeno chamado de “restrição de spin”. Tipicamente, os pares de elétrons têm spins opostos, assim a “restrição” impõe uma dificuldade para que o oxigênio molecular tripleto reaja com os compostos orgânicos. Contudo, a transferência de energia e o transporte de elétrons podem converter o oxigênio de seu estado basal para formas mais reativas as EROs (Figura 2) (APEL & HIRT, 2004).



**Figura 2.** Geração de diferentes EROs pela transferência de energia ou redução univalente seqüencial do oxigênio no estado basal tripleto.

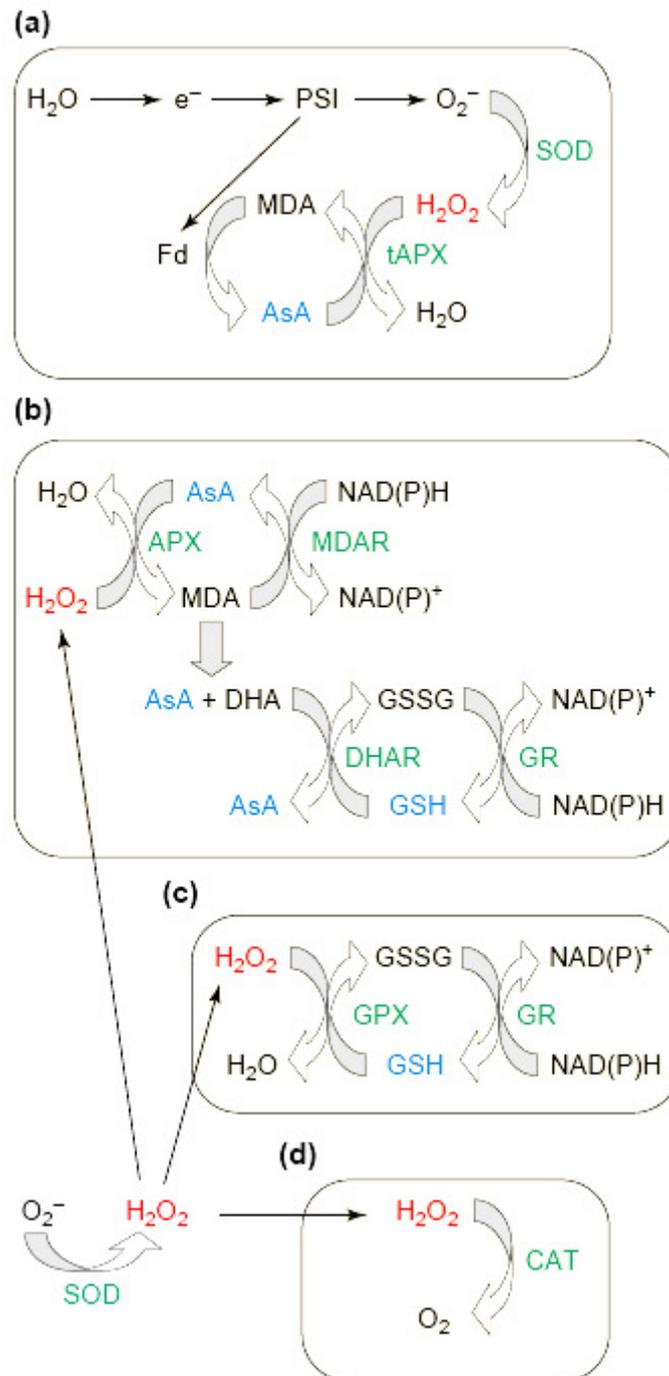
O excesso na produção de EROs pode representar um risco às células. O oxigênio singleto ( ${}^1O_2$ ) pode potencialmente levar a oxidação de lipídeos, proteínas e pigmentos. As membranas dos tilacóides são especialmente suscetíveis ao dano pelo oxigênio singleto por conta da grande quantidade de cadeias laterais de ácidos graxos. A reação entre o  ${}^1O_2$  com esses lipídeos produz hidroperóxidos e inicia reações na cadeia em radicais peroxil nas membranas dos tilacóides. Também pode haver danos a co-fatores críticos de pigmentos e

danos às subunidades associadas ao FSII, especialmente a proteína D1, resultando em inativação foto-oxidativa total do centro de reação. No FSI os danos pelo oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxilas (OH) incluem inativação de enzimas-chave do metabolismo de fixação de carbono como fosforibuloquinase, frutose-1,6-bisfosfatase e NADP-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (NIYOGI, 1999).

As plantas possuem vários meios para minimizar os efeitos deletérios das EROs. Esses incluem uma gama de enzimas antioxidantes e metabólitos que desintoxicam essas formas de EROs, além de um mecanismo que dissipa o excesso de energia absorvida antes da formação de oxigênio singlete. O mais importante mecanismo de “limpeza” das EROs inclui a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), a ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11) e catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), além do aumento nos níveis de antioxidantes não-enzimáticos como o ascorbato, glutathione, tocoferol, alcalóides, flavonóides e carotenóides (ASADA, 1999; APEL & HIRT, 2004).

O balanço entre as atividades das enzimas SOD, APX e CAT, determina o “steady-state” dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio nas células. A SOD é encontrada em quase todos os compartimentos celulares, participando no ciclo água-água nos cloroplastos, bem como do ciclo ascorbato-glutathione nos cloroplastos, citosol, mitocôndrias, apoplastos e peroxissomos. A APX por ser encontrada em quase todas as organelas celulares, participando do ciclo ascorbato-glutathione, e por ter uma alta afinidade pelo  $H_2O_2$  é de importância fundamental para o controle das EROs nesses compartimentos. A CAT está presente apenas em peroxissomos, porém é indispensável para a detoxificação em altas produções de EROs, pois o estresse oxidativo causa proliferação dos peroxissomos nas células (MITTLER, 2002). As vias de detoxificação de EROs estão ilustradas na Figura 3.

O ciclo água-água obtém energia redutora diretamente do aparato fotossintético. Dessa forma esse, parece ser autônomo com seu respectivo suprimento de energia. Já o suprimento de energia redutora para o ciclo ascorbato-glutathione, durante situações normais e principalmente durante situações de estresse onde o aparato fotossintético pode estar danificado ou suprimido, ainda não está totalmente esclarecida. Em animais e fungos a energia para a remoção das EROs vem da rota das pentoses-fosfato, onde o NADPH é a principal fonte de poder redutor (MITTLER, 2002).



**Figura 3** Vias de Limpeza de EROs nas plantas. a) o ciclo água-água; b) o ciclo ascorbato-glutationa; c) o ciclo glutatona peroxidase e d) catalase. PSI= fotossistema I;  $O_2^-$ = radical superóxido; Fd= ferredoxina; AsA= ascorbato; MDA= monodehidroascorbato;  $H_2O$ = água; SOD= superóxido dismutase; APX= ascorbato peroxidase; MDAR= monodehidroascorbato redutase; NADPH= fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reduzido; NADP+= fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; DHA= dehidroascorbato; DHAR= dehidroascorbato redutase; GSSG= glutatona oxidada; GSH= glutatona reduzida; GR= glutatona redutase; GPX= glutatona peroxidase; CAT= catalase.

### 2.6.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD constitui a primeira linha de defesa das plantas contra o EROs. Essa enzima é classificada como uma metaloproteína que catalisa a dismutação dos radicais superóxidos ( $O_2^-$ ) a oxigênio molecular e  $H_2O_2$  (Figura 4). A atividade dessa enzima foi descrita a primeira vez por McCord and Fridovich em 1969 (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977).

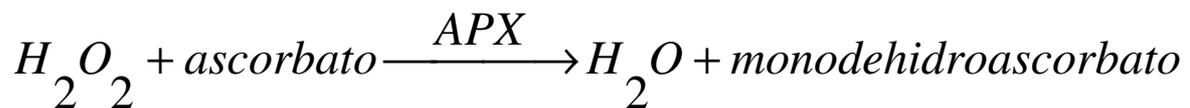


**Figura 4.** Reação catalisada pela superóxido dismutase.

As membranas fosfolipídicas são impermeáveis a moléculas carregadas de  $O_2^-$ , sendo assim a SOD tem importância fundamental na remoção desses  $O_2^-$  nos compartimentos onde são formados. As SODs são classificadas de acordo com seu metal co-fator, em três grupos: FeSOD, presente nos cloroplastos; MnSOD, presentes nas mitocôndrias e peroxissomas; e as Cu/Zn-SODs, presentes nos cloroplastos, peroxissomos, no citosol e possivelmente no espaço extracelular (ALSCHER et al., 2002).

### 2.6.2 Ascorbato peroxidase (APX)

Em plantas o mais importante redutor para o  $H_2O_2$  é o ascorbato. A APX usa duas moléculas de ascorbato para reduzir o peróxido de hidrogênio à água, com a geração concomitante de duas moléculas de monodehidroascorbato (MDHA) (Figura 5). (NOCTOR & FOYER, 1998).



**Figura 5.** Reação catalisada pela ascorbato peroxidase.

A família APX consiste em pelo menos cinco isoformas diferentes, incluindo formas ligadas aos tilacóides dos cloroplastos e as membranas de microcorpos, assim como enzima solúvel no estroma, citoplasma e apoplasto. Os genes que codificam as isoformas

de APX respondem diferentemente a sinais metabólicos e ambientais (NOCTOR & FOYER, 1998).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Instalação dos experimentos

O presente trabalho foi constituído por dois experimentos, sendo um com a espécie *Emilia coccinea* e outro com a espécie *Digitaria horizontalis*. Os ensaios foram conduzidos em abrigo telado, com cobertura sombrite (bloqueio de 30% da radiação), localizadas no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL) (09°28'02''S; 35°44'43''W; 127 m), no município de Rio Largo, Alagoas, no período de dezembro de 2008 a março de 2009.

As variáveis meteorológicas durante o período experimental foram registradas em estação automática, localizada no CECA/UFAL e os valores cedidos pelo Laboratório de Agrometeorologia e Radiação Solar (LARAS) da UFAL. As temperaturas máxima e mínima do ar foram de 34,3 °C e 20,2 °C, respectivamente, a umidade relativa do ar foi de 79,4% e a radiação solar global (de 8 às 14:00 h) foi de 3820,0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

As espécies estudadas foram escolhidas em função da alta incidência em áreas comerciais de cultivo de cana-de-açúcar no Estado de Alagoas e por apresentarem sementes com alto percentual de germinação. As sementes das espécies citadas foram obtidas de áreas de cultivo comercial das Usinas Coruripe e Usina Caeté-Unidade Cachoeira nos meses de agosto e setembro de 2008.

Inicialmente realizou-se a semeadura em vasos com capacidade para 7 litros, com área superficial de 615,75  $\text{cm}^2$ , contendo solo peneirado e solarizado como substrato. As características químicas do solo utilizado nos experimentos estão apresentadas na Tabela 1. Quinze dias após a emergência das plântulas fez-se o desbaste deixando-se densidade equivalente a 200 plantas  $\text{m}^{-2}$ .

Trinta dias após a semeadura, quando as plantas tinham de 4 a 6 folhas, fez-se a aplicação do produto comercial Sinerge EC® (FMC Agricultural Products, composto pela mistura clomazone + ametrina, cuja dose comercial recomendada é de 5 L  $\text{ha}^{-1}$ ). Embora a recomendação comercial de aplicação em pós-emergência desse herbicida seja quando as plantas apresentam de 3 a 4 folhas (ANDREI, 2005) no presente estudo, essa aplicação foi mais tardia devido à necessidade de material vegetal para as análises bioquímicas posteriores.

**Tabela 1.** Análise química do substrato utilizado nos experimentos com as espécies *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* submetidas a diferentes doses da mistura de clomazone+ametrina.

ANÁLISE QUÍMICA	
pH (em água)	5,6
Na (mg dm <sup>-3</sup> )	21
P (mg dm <sup>-3</sup> )	2
K (mg dm <sup>-3</sup> )	84
Ca+Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,9
Ca (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,6
Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,3
Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,02
H <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	5,5
SB	3,21
C.T.C. efetiva	3,23
C.T.C. pH 7,0	8,71
V (%)	36,8
M (%)	0,6
Na (%)	1,1
Mat.Org	2,09
Ferro (mg dm <sup>-3</sup> )	210,5
Cobre (mg dm <sup>-3</sup> )	1,72
Zinco (mg dm <sup>-3</sup> )	1,56
Manganês (mg dm <sup>-3</sup> )	2,33

Os tratamentos consistiram nas seguintes doses do herbicida, definidas em função da recomendação comercial:

T1- 0 (testemunha);

T2- 2,5 L. ha<sup>-1</sup> (0,5 kg i.a ha<sup>-1</sup> de clomazone + 0,75 kg i.a ha<sup>-1</sup> de ametrina) ;

T3- 5 L. ha<sup>-1</sup> (1 kg i.a ha<sup>-1</sup> de clomazone + 1,5 kg i.a ha<sup>-1</sup> de ametrina);

T4- 10 L. ha<sup>-1</sup> (2 kg i.a ha<sup>-1</sup> de clomazone + 3 kg i.a ha<sup>-1</sup> de ametrina);

A aplicação do produto foi realizada com pulverizador costal provido de bicos (Teejet 110.04) de média/alta vazão (1,5 L.min<sup>-1</sup>) e com volume de aplicação de 350 L.ha<sup>-1</sup> (Figura 6).



**Figura 6.** Aplicação da mistura de clomazone+ametrina em plantas de *Emilia coccinea*, trinta dias após sementeira.

### 3.2 Variáveis analisadas

Foram realizadas medições e coletas nos períodos de 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação (HAA) do herbicida, procedendo-se análises preliminares que indicaram o período de 72 HAA como aquele em que o efeito do herbicida foi mais pronunciado, o qual foi adotado para quantificação das variáveis analisadas no presente estudo.

As 72 HAA do herbicida foram analisadas as seguintes variáveis: fluorescência da clorofila *a*, área foliar e teor de pigmentos fotossintéticos, extravasamento de eletrólitos, proteínas solúveis, atividade das enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e do teor de MDA (malonaldeído) no tecido foliar.

Exceto para o teor de pigmentos fotossintéticos e extravasamento de eletrólitos, cuja determinação ocorreu com material recém-coletado, o material foliar foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em congelador (*ultrafreezer*), a -80 °C, até a realização das análises.

Após 25 dias da aplicação (DAA) do herbicida, foram contabilizados o número de plantas vivas e de mortas e o percentual de mortalidade e determinada a massa seca das plantas.

### 3.2.1 Emissões de fluorescência da clorofila *a*

As medidas de fluorescência foram realizadas com um fluorômetro portátil de luz modulada de halogênio (35W) (Opti-Sciences, modelo OS1-FL, Hudson, USA) com duração do pulso de luz saturante de 0,5 s. Cada repetição foi obtida pela média de duas leituras realizadas na mesma folha (terceira folha de cima para baixo), no início da manhã (6:00h).

Os seguintes parâmetros de fluorescência da clorofila foram determinados: fluorescência inicial ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ) após um período de adaptação ao escuro de 20 minutos e rendimento quântico efetivo do FSII (YIELD) sob luz ambiente. Os valores finais foram representam as leituras realizadas 72 horas após a aplicação da mistura de herbicidas.

### 3.2.2 Determinações dos teores de pigmentos fotossintéticos

A determinação dos teores de clorofila total (CT) e de carotenóides (CAROT) foi feita através do método de extração com acetona (HENDRY & GRIME, 1993). Para tanto, amostras de 20 mg de tecido foliar fresco (primeira folha de cima para baixo), foram picotadas em tubos de ensaio com tampa rosqueável, contendo 5 mL de acetona a 80% (v/v), protegidos da luz com papel alumínio e deixados em refrigerador, por 72 horas. Cada repetição foi extraída em triplicata. Após este período, foram determinadas as absorbâncias em espectrofotômetro a 480, 645 e 663 nm e utilizadas às seguintes formulas para a obtenção dos teores de pigmentos fotossintéticos:

$$\text{clorofilatotal} = \frac{(8,02 * A_{663} + 20,2) * V}{MF} \quad (\text{mg.g}^{-1} \text{ MF})$$

$$\text{carotenóides} = \frac{(A_{480} + 0,114 * A_{663} - 0,638 * A_{645}) * V * 10^3}{112,5 * MF} \quad (\mu\text{mol .g}^{-1} \text{ MF})$$

Onde:

A480, A663 e A645 = absorbâncias em 480, 663 e 645 nm, respectivamente;

V = volume de acetona a 80%.

MF = peso de matéria fresca.

### **3.2.3 Proteínas solúveis**

O extrato vegetal foi obtido a partir da maceração de 20 mg do tecido vegetal (segunda folha de cima para baixo) em 2 mL do tampão TRIS-HCl 80 mM pH 7,4 (ALLA et al., 2008), e depois retirada uma fração de 0,05 mL do sobrenadante para a determinação dos teores de proteínas solúveis. Em seguida adicionou-se 0,95 mL do reagente coomassie blue (BRADFORD, 1976). Este reagente foi preparado dissolvendo-se 100 mg de coomassie brilliant blue G-250 (Sigma Chemical Company) em 50 mL de álcool etílico a 95%, seguindo-se da adição de 100 mL de ácido fosfórico a 85%. A solução teve seu volume final completado para 1000 mL com água destilada.

As proteínas solúveis foram, então, determinadas pelas medidas de absorvância em 595 nm, utilizando-se como branco a mistura de 0,05 mL do tampão de extração e 0,95 mL do reagente do coomassie. Como padrão foi utilizado a albumina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Company) e os resultados foram expressos em mg g<sup>-1</sup> MF. Cada amostra foi representada por um extrato simples dosado em triplicata.

### **3.2.4 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada conforme Giannopolitis e Ries (1977) com algumas modificações. O extrato vegetal foi obtido a partir de 100 mg de tecido vegetal (terceira folha de cima para baixo), macerados em 2 mL do meio de extração. O meio de extração foi preparado com: Tampão Fosfato de Potássio (TFK) 100 mM pH 7,8; EDTA a 0,1 mM; DTT a 1mM; β-Mercaptoetanol 10 mM; Triton x 100 a 0,1%; PVPP a 30% (p/p) completando o volume com água deionizada.

Após a centrifugação a 15000g por 15 minutos a 4<sup>o</sup>C, foi retirada uma alíquota de 40 µL do sobrenadante a qual foi colocada no meio de reação. Sendo este preparado com TFK a 52,5 mM pH 7,8; EDTA a 0,0001 mM; nitro blue tetrazolium chloride (NBT) (Sigma Chemical Company) a 0,075 mM; metionina a 13 mM (Sigma Chemical Company) e riboflavina a 0,002 mM, completando o volume com água deionizada.

Os tubos contendo o meio de reação foram colocados em uma câmara com luz fluorescente de 15 watts por 10 minutos, para a ocorrência da reação. Após esse período, transferiu-se o volume total para uma cubeta de 3,0 mL e leu-se em espectrofotômetro a 560 nm. A determinação da atividade da SOD é dada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitroblutetrazólio (NBT) na presença de luz, e a reação é paralizada com o apagar da luz. Desta forma observou-se a formação da formazana azul

utilizando o meio de reação sem a adição de extrato vegetal por 10 minutos. Assim as unidades da SOD foram calculadas pela fórmula:

$$\text{Unidade SOD} = [(\text{ABS } 560 \text{ Formazana azul} / \text{ABS } 560 \text{ amostra vegetal}) - 1]$$

Os valores foram expressos em unidades de SOD  $\text{mg}^{-1}$  proteína, onde cada amostra foi representada por um extrato simples dosado em triplicata.

### **3.2.5 Atividade da Ascorbato peroxidase (APX)**

A atividade da APX foi determinada conforme Nakano e Asada (1981) com algumas modificações. O extrato vegetal foi obtido a partir de 100 mg de tecido vegetal (terceira folha de cima para baixo) macerados em 2 mL do meio de extração. O meio de extração foi preparado com: Tampão Fosfato de Potássio (TFK) 50 mM pH 7,5; EDTA a 2 mM; ascorbato de sódio a 20 mM; Triton X 100 a 0,1%; PVPP a 30% (p/p) completando o volume com água deionizada.

Após a centrifugação a 15000g por 15 minutos, a 4°C, foi retirada uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  e colocada no meio de reação. Este foi preparado com: TFK a 50 mM pH 7,8;  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,1 mM; ascorbato de sódio a 0,5 mM, completando com o volume com água deionizada para 1 ml. Os reagentes do meio de reação foram colocados a 25°C em banho-maria, exceto o extrato que ficou no gelo.

A reação iniciou-se após adição de extrato vegetal na cubeta de quartzo, com o meio de reação. As leituras foram realizadas na absorbância de 290 nm por 1 minuto, observando decréscimo na concentração do ascorbato. Foi utilizado o coeficiente de extinção do ascorbato de 2,8  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  a 290 nm para a realização dos cálculos. Os valores foram expressos em unidades de APX  $\text{mg}^{-1}$  proteína, onde cada amostra foi representada por um extrato simples dosado em triplicata.

### **3.2.6 Extravasamento de eletrólitos**

O extravasamento eletrolítico foi determinado conforme a metodologia proposta por Flint et al. (1966), com alterações. Dez discos de 6 mm de diâmetro foram coletados dos tecidos foliares (segunda folha de cima para baixo) e imediatamente lavados em água deionizada, para retirar o material que tenha extravasado após o corte.

Em seguida os discos foram dispostos com a superfície adaxial para cima em pesa filtro com 50 ml de água deionizada e tampado. Após 6 horas procedeu-se a primeira leitura das com um medidor de condutividade (CD-850, INSTRUTHERM, São Paulo, São Paulo, Brasil). Após isso, as tampas foram substituídas por uma camada de papel alumínio e vedados com Parafilm ®. Levando os pesa filtros para estufa regulada para 90 °C por 2 horas. A última leitura foi realizada após o resfriamento das soluções ao ambiente. Cada amostra foi resultado de uma leitura por repetição.

Os cálculos foram realizados utilizando a seguinte fórmula:

$$\left( \frac{\textit{condutividade elétrica anterior}}{\textit{condutividade elétrica pós – estufa}} \right) * 100$$

Os valores foram expressos em percentagem de extravasamento de eletrólitos em relação ao total extravasado (após a estufa).

### **3.2.7 Peroxidação de Lipídeos**

A peroxidação de lipídeos foi estimada pelo teor de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso em equivalentes de aldeído malônico, MDA (CAKMAK & HORST, 1991). A extração foi realizada pela homogeneização de 100 mg de tecido foliar (segunda folha de cima para baixo) em 2 mL de ácido tricloroacético 0,1% (p/v) e o homogenato foi centrifugado a 15.000 g, por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a uma alíquota de 500 µL deste foi adicionado 1,5 mL de TBA 0,5% (preparado em ácido tricloroacético 20%).

Os tubos foram fortemente agitados e incubados a 90 °C, por 20 min. A reação foi paralisada em banho de gelo e a mistura clarificada por centrifugação a 13.000 g, por 8 min a 4°C. Em seguida, a absorbância da amostra foi registrada a 532 nm em espectrofotômetro e a inespecífica (a 600 nm) descontada. Os resultados foram expressos em nmol de MDA g<sup>-1</sup> matéria fresca, onde cada amostra foi representada por um extrato simples dosado em triplicata.

### **3.2.8 Área foliar, matéria seca e mortalidade das plantas**

A área foliar, de uma planta por parcela, foi medida com um medidor de área foliar de bancada (LI 3100, LI-COR, inc. Lincoln, Nebraska, USA) após 72 horas da aplicação da mistura de clomazone+ametrina.

Após 25 dias da aplicação do herbicida, foram contabilizadas o número de plantas vivas e de mortas e o percentual de mortalidade. Em seguida as plantas (mortas e vivas) foram coletadas e colocadas para secagem em estufa, até peso constante, para a determinação da matéria seca total por parcela, cujo valor foi dividido pela densidade média de planta para se obter a matéria seca por planta.

### **3.3. Delineamento e análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis repetições. Onde cada parcela foi composta por um vaso.

Para os dados de frequências foi utilizado o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) verificando diferenças apenas para os tratamentos que receberam a mistura de herbicidas.

Os dados de clorofila total, carotenóides, fluorescência inicial ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ), rendimento quântico efetivo do FSII (YIELD), proteínas solúveis, atividade da SOD, atividade da APX, extravasamento de eletrólitos, peroxidação de lipídeos, área foliar e matéria seca (MS) foram submetidos à análise de variância e análise de regressão exponencial ( $y = a \cdot e^{bx}$ ) ou regressão linear ( $y = a + bx$ ); o decréscimo médio foi obtido através da derivada da função no ponto médio.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Teores de pigmentos fotossintéticos

As doses da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina) tiveram efeito altamente significativo sobre os teores de clorofila total e carotenóides, 72 horas após aplicação, nas duas espécies estudadas (Tabela 2).

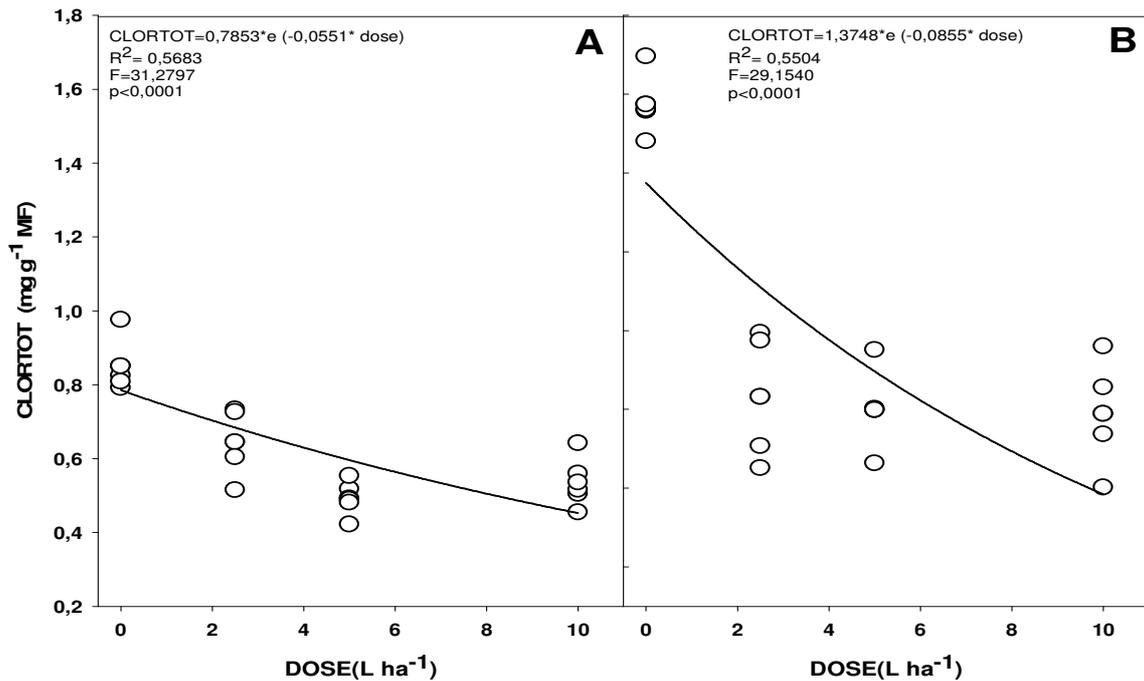
**Tabela 2.** Média dos teores de pigmentos fotossintéticos de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância.

DOSE (L.ha <sup>-1</sup> )	<i>E. coccinea</i>		<i>D. horizontalis</i>	
	CLORTOT.	CAROT.	CLORTOT.	CAROT.
0,0	0,8503	0,2500	1,5741	0,5405
2,5	0,6448	0,1847	0,8319	0,2286
5,0	0,4926	0,1492	0,8021	0,2375
10,0	0,5357	0,1309	0,7890	0,1964
<b>CV (%)</b>	10,2500	16,6300	10,7800	12,9400
<b>F</b>	36,5920	18,7510	76,0900	102,3920
<b>p&lt;</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

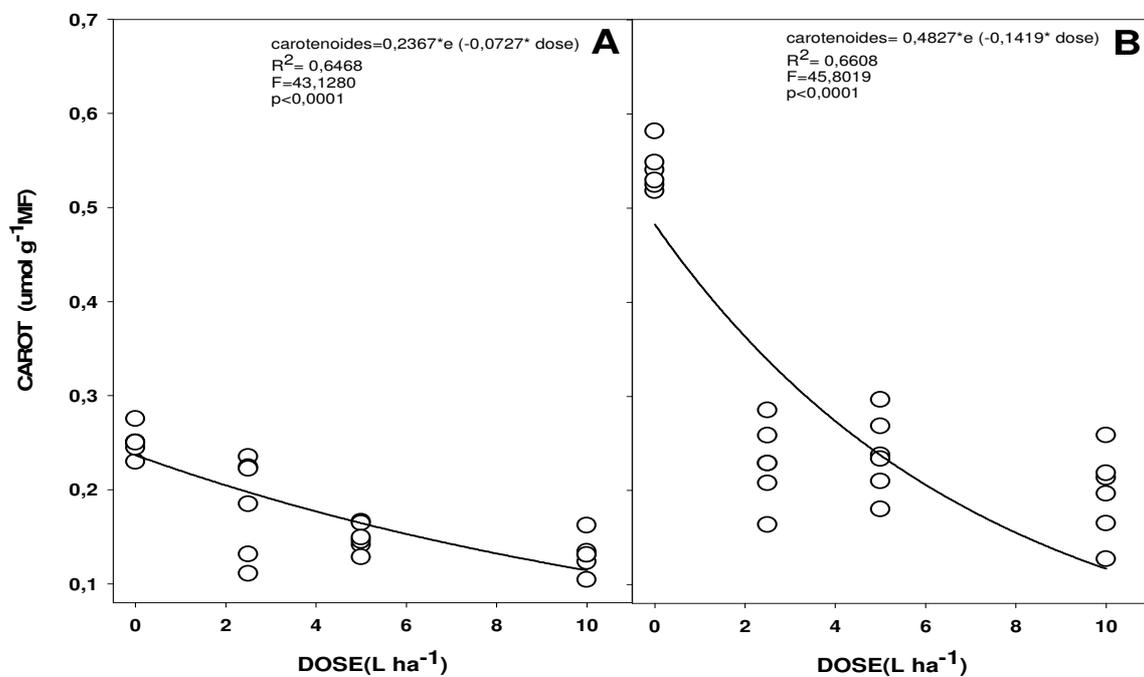
\* CLORTOT= clorofila total em mg g<sup>-1</sup> MF; CAROT= carotenóides em μmol g<sup>-1</sup> MF;

Os teores de clorofila e carotenóides apresentaram decréscimos exponenciais, significativos, em função das doses do produto aplicado nas espécies *E. coccinea* e *D. horizontalis* (Figuras 7 e 8). Na espécie *E. coccinea* houve decréscimo médio de 0,0347 mg g<sup>-1</sup> MF de clorofila total para cada litro da mistura aplicada, enquanto na *D. horizontalis* este decréscimo médio foi bem mais acentuado: 0,0854 mg g<sup>-1</sup> MF de clorofila total para cada litro da mistura aplicada. O decréscimo médio dos valores de carotenóides da espécie *D. horizontalis* (0,0427 μmol g<sup>-1</sup> MF) foi cerca de três vezes maior que o da *E. coccinea* (0,0129 μmol g<sup>-1</sup> MF). Os sintomas visuais de clorose e necrose dos tecidos, que representam a perda de clorofila, estão apresentados nas Figuras 9 e 10.

O decréscimo do conteúdo de clorofila e de carotenóides associado à aplicação de herbicidas tem sido relatado pelo efeito de diversas moléculas e em diferentes espécies, como *Hordeum vulgare* (KAŇA et al., 2004), *Myracrodruon urundeuva* (DUARTE et al., 2006), *Ananas comosus* (CATUNDA et al., 2005) entre outras.



**Figura 7.** Teores de clorofila total de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.



**Figura 8.** Teores de carotenóides de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.



**Figura 9.** Sintomas visuais da mistura de clomazone+ametryn após 72 horas da aplicação em *Emilia coccinea*. Onde a,b,c e d são respectivamente as doses de 0; 2,5; 5; e 10 L.ha<sup>-1</sup>.



**Figura 10** Sintomas da mistura de clomazone+ametryn após 72 horas da aplicação em *Digitaria horizontalis*. Onde a,b,c e d são respectivamente as doses de 0; 2,5; 5 e 10 L ha<sup>-1</sup>.

A queda nos teores dos pigmentos após aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina deve-se em parte à inibição ou redução do acúmulo de pigmentos nos plastídios de plantas suscetíveis, causada pela molécula do clomazone (FERHATOGLU & BARETT, 2006). Essa inibição resulta em sintomas conhecidos como branqueamento e/ou desenvolvimento dos tecidos com a coloração violácea (NORMAN et al., 1990). A toxicidade e o branqueamento observado em plantas suscetíveis ao clomazone são causados pela ativação metabólica do clomazone a 5-OH clomazone e subsequentemente a 5-ceto clomazone, esse último sendo ativamente tóxico (FERHATOGLU & BARETT, 2006). O 5-ceto clomazone causa queda do teor dos pigmentos pela inibição da síntese de isoprenoídes cloroplastídicos, bloqueando a atividade da DOXP sintase (1-Deoxi-D-Xilulose-5-P) na rota do MEP (2-C-Metil-D-eritritol-4-P) (MUELLER et al., 2000).

O decréscimo dos pigmentos fotossintéticos também está relacionado ao segundo ingrediente ativo, a ametrina, da mistura de herbicida usada no presente estudo. A ametrina por bloquear o transporte de elétrons entre a  $Q_A$  e  $Q_B$ , leva a formação de radicais livres ( $O_2^-$  e  $Chl^3$ ) pela energia não aproveitada no processo fotossintético. Esses radicais livres reagem com moléculas importantes no cloroplasto como a clorofila e lipídeos insaturados, levando ao declínio do conteúdo dos pigmentos fotossintéticos (DEVINE e SHUKLA, 2000).

#### 4.2 Emissão de Fluorescência

A emissão de fluorescência da clorofila *a* também foi alterada significativamente pelas doses do herbicida Sinerge EC ®, tanto na monocotiledônea quanto na dicotiledônea (Tabela 3).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (fluorescência máxima (Fm), rendimento quântico potencial (Fv/FM) e rendimento quântico efetivo (YIELD)) apresentaram redução exponencial (Figuras 11, 12 e 13), enquanto a fluorescência inicial (Fo) apresentou redução linear (Figura 14), ambas significativas em função das doses do herbicida. As reduções médias de Fm, Fv/Fm e YIELD em função da aplicação do herbicida foram de 293; 0,158; 0,192 L<sup>-1</sup> aplicado, respectivamente para *E. coccinea* e 310; 0,224; 0,235 L<sup>-1</sup> aplicado para *D. horizontalis*. Quanto ao Fo, *E. coccinea* apresentou redução de 13,467 para cada litro do herbicida aplicado, já *D. horizontalis* apresentou decréscimo ligeiramente maior, de 16,586 para cada litro do produto.

**Tabela 3.** Média dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância.

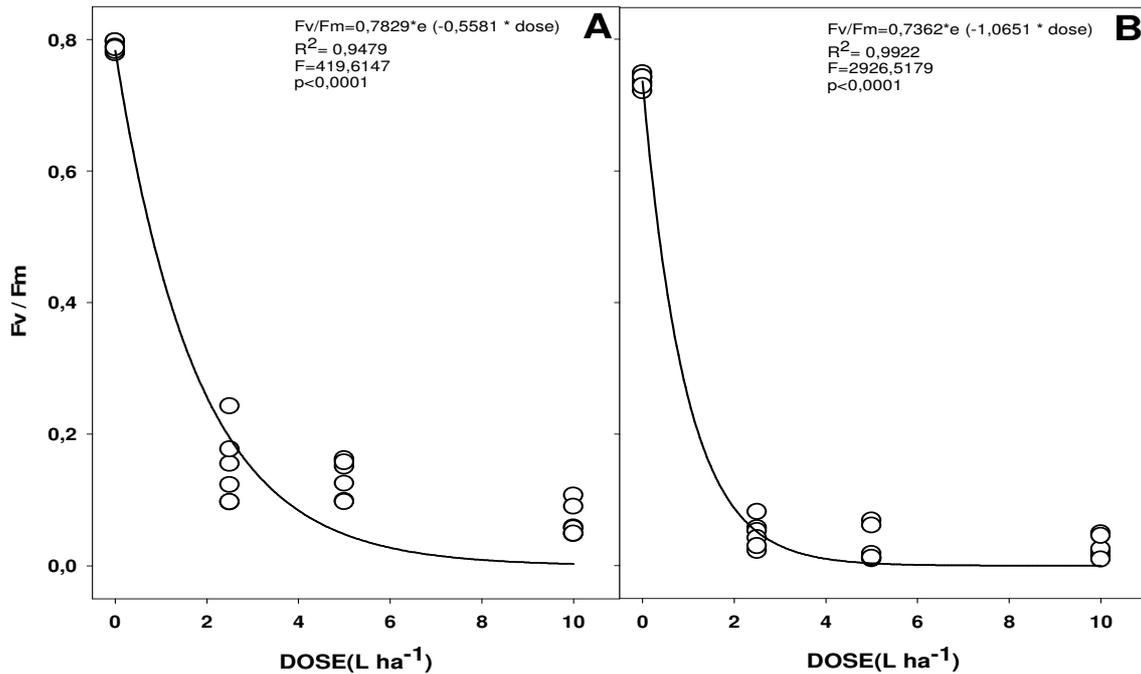
DOSE (L.ha <sup>-1</sup> )	<i>E. coccínea</i>				<i>D. horizontalis</i>			
	Fo	Fm	Fv/Fm	YIELD	Fo	Fm	Fv/Fm	YIELD
0,0	393,5833	1853,4167	0,7888	0,6471	446,7500	1712,7500	0,7363	0,5739
2,5	294,3733	452,5000	0,1485	0,0450	373,2917	415,5833	0,0476	0,0112
5,0	282,5833	514,6667	0,1318	0,0496	306,9167	323,7083	0,0301	0,0098
10,0	246,1667	349,6000	0,0683	0,0232	286,7083	344,1667	0,0274	0,0081
<b>CV (%)</b>	10,9800	15,5200	11,9900	8,1800	13,1400	12,9300	9,3900	12,1300
<b>F</b>	21,3640	186,4740	589,7230	2266,2720	14,5800	336,4630	1894,1710	1428,2220
<b>p&lt;</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

\*Fo= fluorescência inicial; Fm= fluorescência máxima; Fv/Fm= rendimento quântico máxima; YIELD= rendimento quântico efetivo

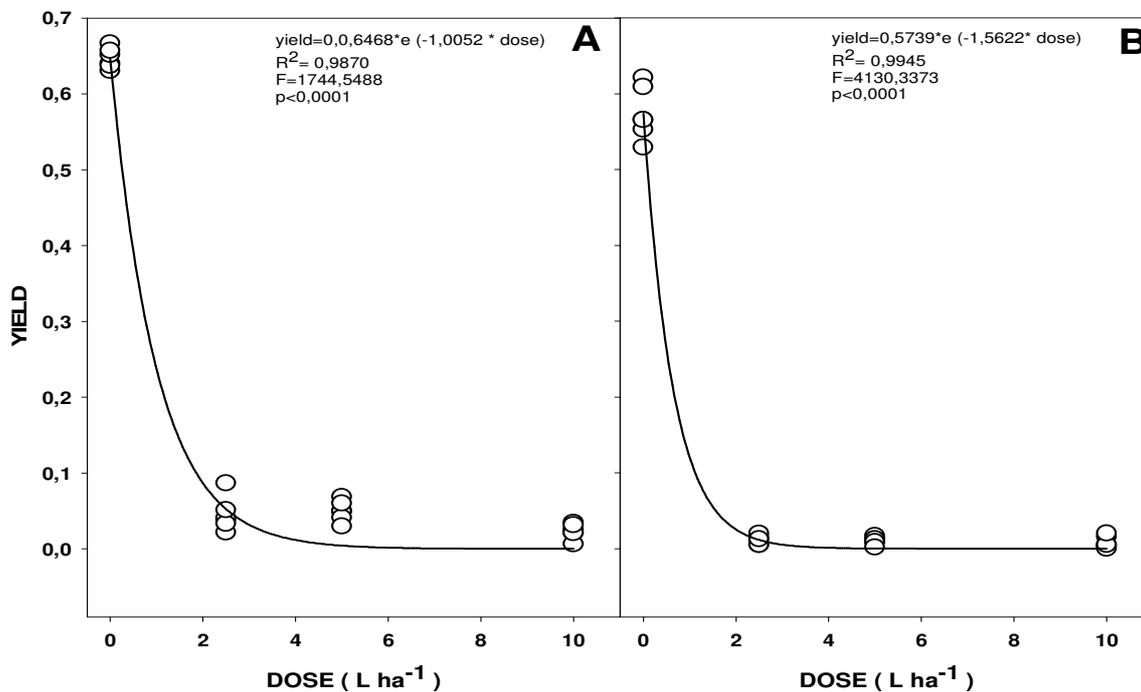
A provável causa da queda nos valores de Fv/Fm e YIELD está relacionado ao segundo ingrediente ativo presente na mistura de herbicidas, a ametrina. Esta molécula pertence ao grupo químico das triazinas, que inibem a passagem de elétrons no fotossistema II (FSII) possivelmente se ligando a quinona B, e por consequência impedindo a oxidação da quinona A (HOLT, 1993). Matoušková et al. (1999) discutem que existe um efeito adicional causado pelos herbicidas que atuam no FSII até mesmo mais importante que o bloqueio do fluxo de elétrons, que é a inibição da rápida degradação e biossíntese (*turnover*) da proteína D1. O dano à proteína pode ser reparado apenas pela sua substituição no FSII e uma re-síntese completa de seus polipeptídeos seguida pela re-montagem no FSII, o que é inibido pela molécula da ametrina.

Diversos autores têm relatado o decréscimo da eficiência quântica ligado a estresses ambientais de uma forma geral, porém o clomazone isoladamente provocou pequenas mudanças na eficiência quântica máxima em folhas primárias de cevada submetida às doses de 0,25 e 0,5 mM (0,0599 g L<sup>-1</sup> e 0,1198 g L<sup>-1</sup>), evidenciando que o dano direto ao FSII é causado pela ametrina, contida na mistura de herbicidas (KAŇA et al., 2004).

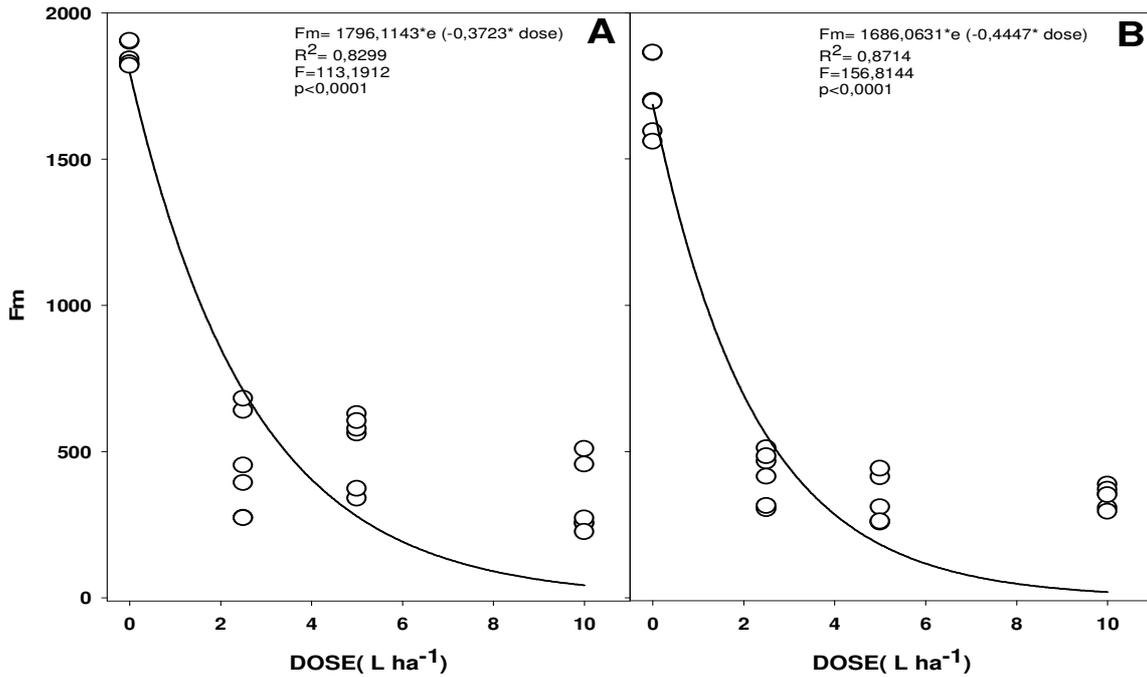
Em estudos sobre os efeitos fitotóxicos de herbicidas a *Ananas comosus*, Catuanda et al. (2006), também verificaram redução na eficiência quântica máxima com a aplicação de inibidores do FSII e FSI (amicarbazone e diuron+paraquat, respectivamente), além de decréscimo da fluorescências máxima e inicial pela mistura de diuron+paraquat.



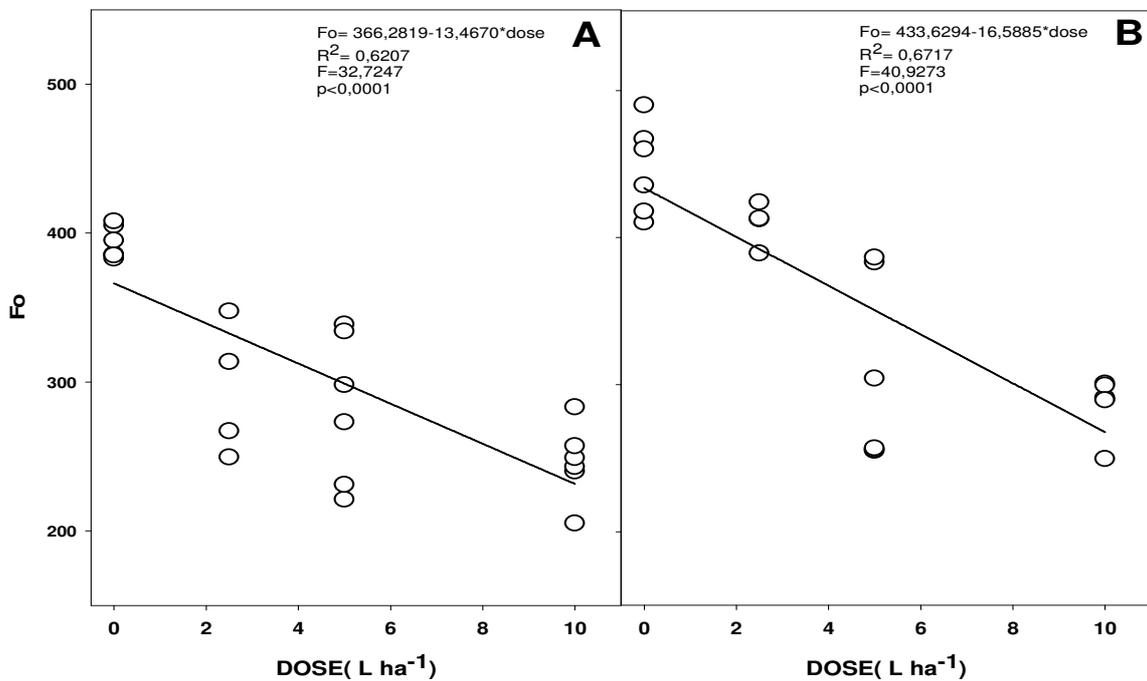
**Figura 11.** Rendimento quântico máximo do FSII de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às leituras realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.



**Figura 12.** Rendimento quântico efetivo do FSII de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às leituras realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.



**Figura 13.** Fluorescência máxima de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às leituras realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.



**Figura 14.** Fluorescência inicial de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às leituras realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.

### 4.3 Proteínas solúveis

As doses da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina) tiveram efeito altamente significativo sobre os conteúdos de proteínas solúveis, 72 horas após aplicação, nas duas espécies estudadas (Tabela 4).

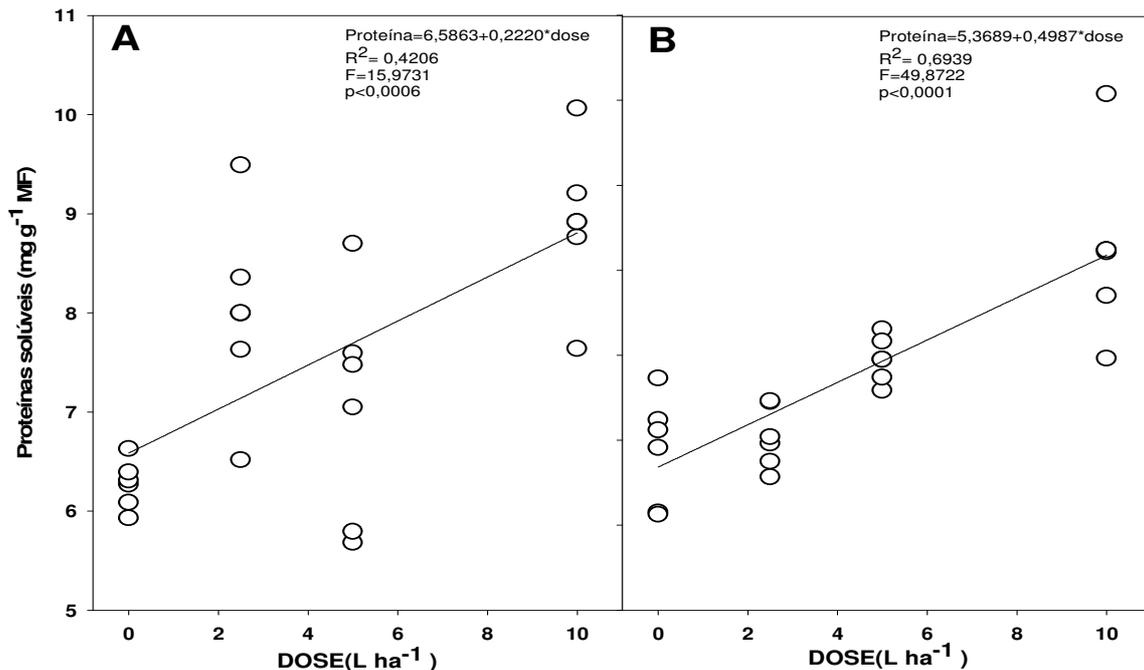
**Tabela 4.** Média dos teores de proteínas solúveis de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância.

	<i>E. coccinea</i>	<i>D. horizontalis</i>
DOSE (L.ha <sup>-1</sup> )	PROT.	PROT.
0	6,2689	5,7573
2,5	7,9968	6,0754
5	7,0477	7,8956
10	8,9166	10,4738
CV (%)	11,34	17,08
F	10,793	16,912
p<	0,0002	0,0000

\*PROT= proteínas solúveis em mg g<sup>-1</sup> MF;

Os teores de proteínas solúveis tiveram aumentos lineares, significativos, em função das doses do produto aplicado nas espécies *E. coccinea* e *D. horizontalis* (Figura 15). O aumento médio dos teores de proteínas solúveis na monocotiledônea foi cerca de duas vezes maior que o aumento médio na dicotiledônea, para cada litro da mistura aplicada.

Aumento dos teores de proteína em plantas pode estar relacionado a diversos estresses. Os estresses abióticos como deficiência hídrica, altas ou baixas temperaturas e deficiência nutricional podem levar ao acúmulo de proteínas de baixo peso molecular (100 kDa) que auxiliam na manutenção da sobrevivência de espécies sob situações adversas. Essas atuam na síntese de outras proteínas, bem como na remoção e eliminação de proteínas não-funcionais e degradadas (WATERS et al., 1996).



**Figura 15.** Proteínas solúveis de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.

Zhu et al. (2009), estudaram a expressão dos genes de soja em relação à aplicação de herbicidas inibidores do FSII (atrazina e bentazon) para investigar a resistência dessa espécie ao bentazon, constatando que as plantas que receberam bentazon, expressaram cerca de 6600 transcritos diferentes em relação àquelas que receberam a atrazina. Os autores observaram que a maioria desses genes envolvia a desintoxicação xenobiótica e antioxidantes como citocromo P450s, glutathiona-S-transferase, SOD e peroxidases, além de genes relacionados com a recuperação celular, como por exemplo, dos componentes ribossomais.

Por outro lado, em plântulas de trigo e de milho com 10 dias de idade, Alla et al. (2008b) observaram decréscimo na formação de proteína por escassez na assimilação de amônia e acúmulo de nitrogênio solúvel, causado pelo herbicida metribuzin, também inibidor do FSII. Esse efeito na síntese protéica, causado pelo metribuzin, deve-se em maioria pela queda da atividade da glutamina sintetase (GS, EC 6.3.1.2) e da atividade da glutamato sintase (GOGAT, EC 1.4.7.1). Embora estes resultados sejam opostos ao observado no presente trabalho, vale salientar que o grupo químico da molécula inibidora do FSII usada no estudo citado pertence ao grupo das triazonas, diferente do grupo químico desse estudo. Houve também diferença em relação à idade das plantas e as próprias espécies são diferentes.

#### 4.4 Enzimas antioxidantes

As doses da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina) também tiveram efeito altamente significativo sobre a atividade da superóxido dismutase, 72 horas após aplicação, nas duas espécies estudadas. Porém para a atividade da ascorbato peroxidase só foi alterada de forma significativa na dicotiledônea (Tabela 5).

**Tabela 5.** Média das atividades das enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância.

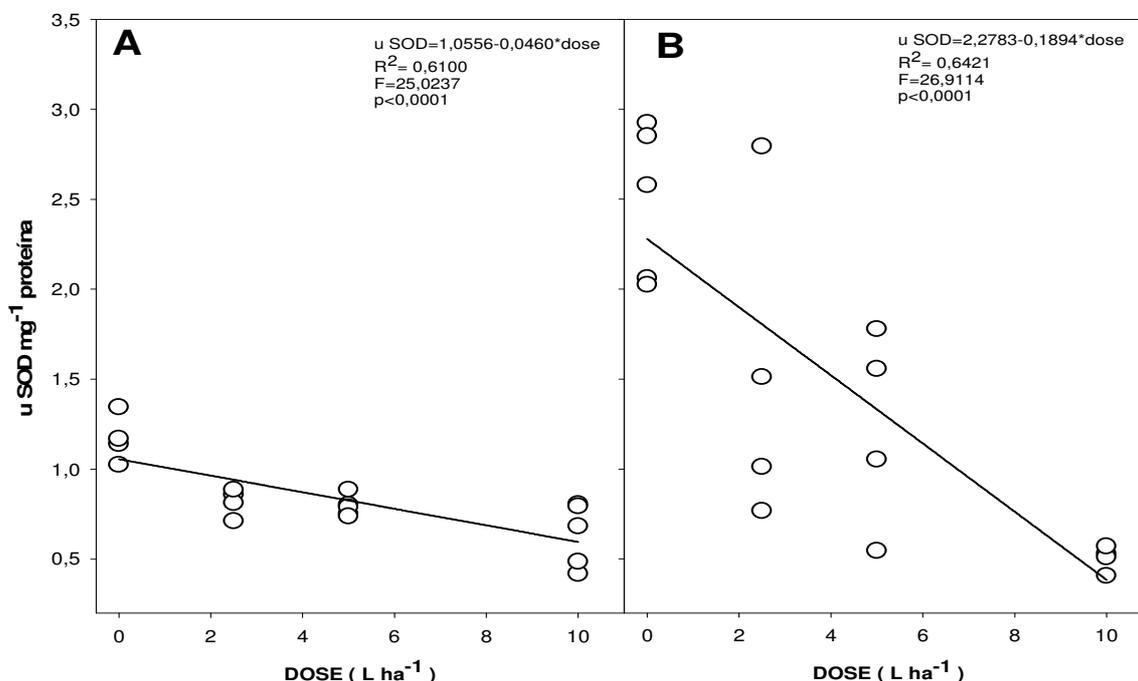
DOSE (L.ha <sup>-1</sup> )	<i>E. coccínea</i>		<i>D. horizontalis</i>	
	SOD	APX	SOD	APX
0	1,1691	0,0073	2,4876	0,0468
2,5	0,8163	0,0131	1,5212	0,048
5	0,7928	0,0051	1,2331	0,0463
10	0,5412	0,0114	0,504	0,0447
<b>CV (%)</b>	18,7300	19,1600	31,5100	18,1300
<b>F</b>	16,5510	25,8570	19,7440	0,1620
<b>p&lt;</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,9209

\* SOD= atividade da superóxido dismutase em uSOD mg<sup>-1</sup> proteína; APX= atividade da ascorbato peroxidase em uAPX mg<sup>-1</sup> proteína;

A atividade da SOD apresentou decréscimo linear significativo, em função das doses do produto aplicado nas espécies *E. coccinea* e *D. horizontalis* (Figura 16). Em *E. coccinea* o decréscimo médio foi de 0,0460 unidades de SOD mg<sup>-1</sup> proteína por litro da mistura aplicada, valor esse cerca de quatro vezes menor que o decréscimo médio apresentado por *D. horizontalis* (0,1894 uSOD mg<sup>-1</sup> proteína por litro da mistura).

Fatores bióticos, abióticos e xenobióticos podem alterar a atividade da SOD, em diversas espécies, como por exemplo, a exposição de plântulas de trigo ao ozônio causou aumento inicial da atividade da SOD, porém esse aumento foi revertido a um decréscimo da atividade dessa enzima, quando aumentou o tempo de exposição ao O<sub>3</sub> (RAO et al., 1995); Por outro lado, o déficit hídrico provocou aumento na geração de EROs e por consequência aumento na atividade da SOD em plântulas de milho (JIANG E ZHANG, 2002). Essa enzima atua como a primeira linha de defesa contra os efeitos nocivos das EROs, em particular do O<sub>2</sub><sup>-</sup>, transformando-o em compostos menos reativos (ASADA, 1999). O decréscimo na atividade da SOD, ocorrido no presente estudo foi também

observado em outros estudos com herbicidas inibidores do FSII (linuron, atrazina), isolados ou em mistura com outros ingredientes ativos.

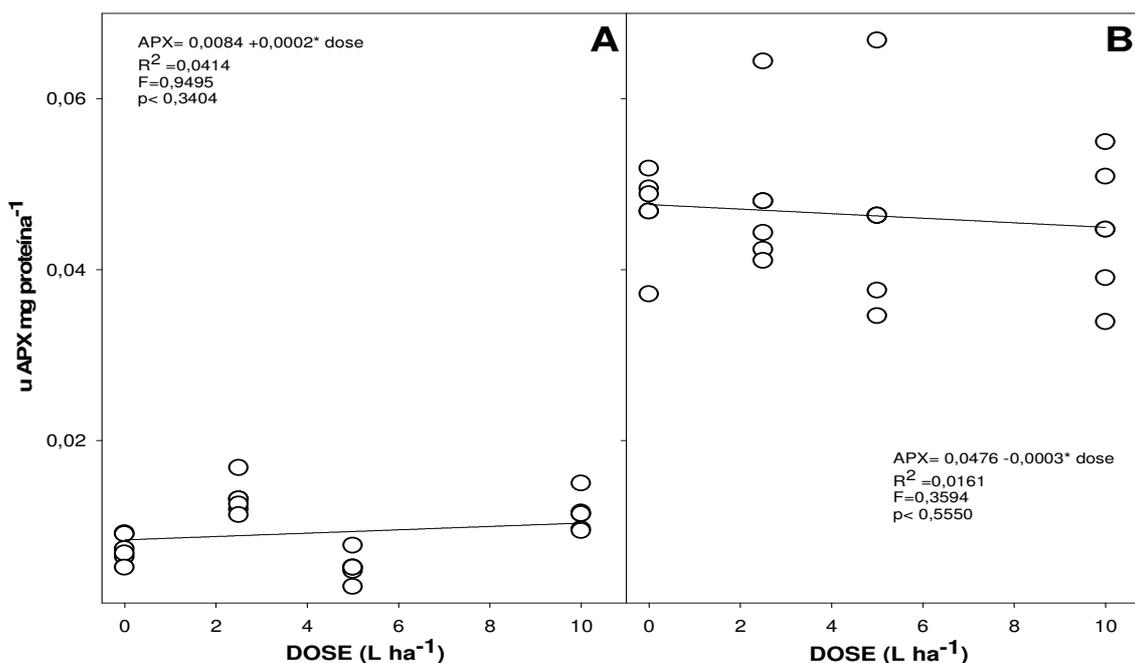


**Figura 16.** Atividade da superóxido dismutase (SOD) de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.

Malenčić et al. (2008) estudaram os efeitos da mistura de linuron (inibidor do FSII) e dimethenamida (inibidor da divisão celular), em pré-emergência, em plantas de soja e de algumas invasoras dessa cultura. Esses verificaram que a atividade da SOD aumentou significativamente, em *Chenopodium album*, *Convolvulus arvensis* e em *Ambrosia artemisiifolia*. Porém em *Glycine max* a enzima teve sua atividade reduzida pela mistura dos herbicidas. Hassan e Alla (2005) estudando o sistema antioxidativo, em feijão (*Vicia faba*) e milho (*Zea mays*), também verificaram que a aplicação, em pós-emergência, de atrazina (inibidor de FSII) causou decréscimo na atividade da SOD em ambas as espécies.

A atividade da APX, acompanhou o comportamento apresentado pela SOD. A APX apresentou aumento linear, não significativo, em função das doses do produto aplicado nas espécies *E. coccinea* e em *D. horizontalis* houve um decréscimo linear, não significativa (Figura 17). Em *E. coccinea* o aumento médio foi de 0,0002 unidades de APX mg<sup>-1</sup> proteína por litro da mistura aplicada e o decréscimo médio de *D. horizontalis* foi de 0,0003 uAPX mg<sup>-1</sup> proteína por litro da mistura.

Assim como a SOD, a atividade da APX também é alterada devido a diversas causas ambientais e em várias espécies, sendo que o comportamento da atividade dessa enzima, está geralmente relacionado ao da SOD (BOWLER et al., 1992). O decréscimo não significativo apresentado por *D. horizontalis* no presente estudo e o aumento não significativo em *E. coccinea* deve-se a redução significativa da atividade da SOD.



**Figura 17.** Atividade da ascorbato peroxidase (APX) de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.

Nos estudos de Hassan e Alla (2005), houve decréscimo da atividade da SOD, e também da APX em plântulas de milho e feijão com 10 dias de idade, dois dias após a aplicação de herbicidas inibidores do FSII. Porém nos estudos com biótipos de *Erigeron canadensis* resistentes e suscetíveis ao paraquat, as atividades da SOD e da APX tiveram comportamento semelhante, onde os resistentes apresentaram suas atividades aumentadas 12 horas após aplicação do herbicida (PYON et al., 2004).

A queda na atividade da SOD e da APX pode ter contribuído para impedir a limpeza das EROs geradas pela aplicação da mistura de clomazone+amietrina. E esse acúmulo de radicais livres, pode também ter refletido na redução apresentada pelos teores de pigmentos de *E.coccinea* e *D.horizontalis*.

De acordo com Bowler et al. (1992) a atividade de todas as isoformas da SOD, em conjunto com as outras enzimas atuam na limpeza das espécies reativas de oxigênio como

a CAT e GR, diminuem quando as plantas entram em senescência. Dessa forma, como 72 HAA as plantas já apresentavam sinais de necrose, os tecidos foliares poderiam estar em estado avançado de degradação e entrado em senescência induzida pela mistura de herbicidas aplicada em doses crescentes. Resultando em um decréscimo da atividade dessas enzimas e perda da capacidade de manter as EROs em níveis celulares aceitáveis para que não ocorresse a degradação de biomoléculas de importância no funcionamento celular como os lipídios.

#### 4.5 Extravasamento de eletrólitos e peroxidação de lipídios

Em relação ao extravasamento de eletrólitos, a mistura de clomazone+ametrina aplicada em doses crescentes alterou significativamente essas variáveis, 72HAA, tanto na mono quanto na dicotiledônea. Já a peroxidação de lipídeos foi alterada ao nível de significância de 2,8% para *E. coccinea* e ao nível de 15,8 % de significância para *D. horizontalis* (Tabela 6).

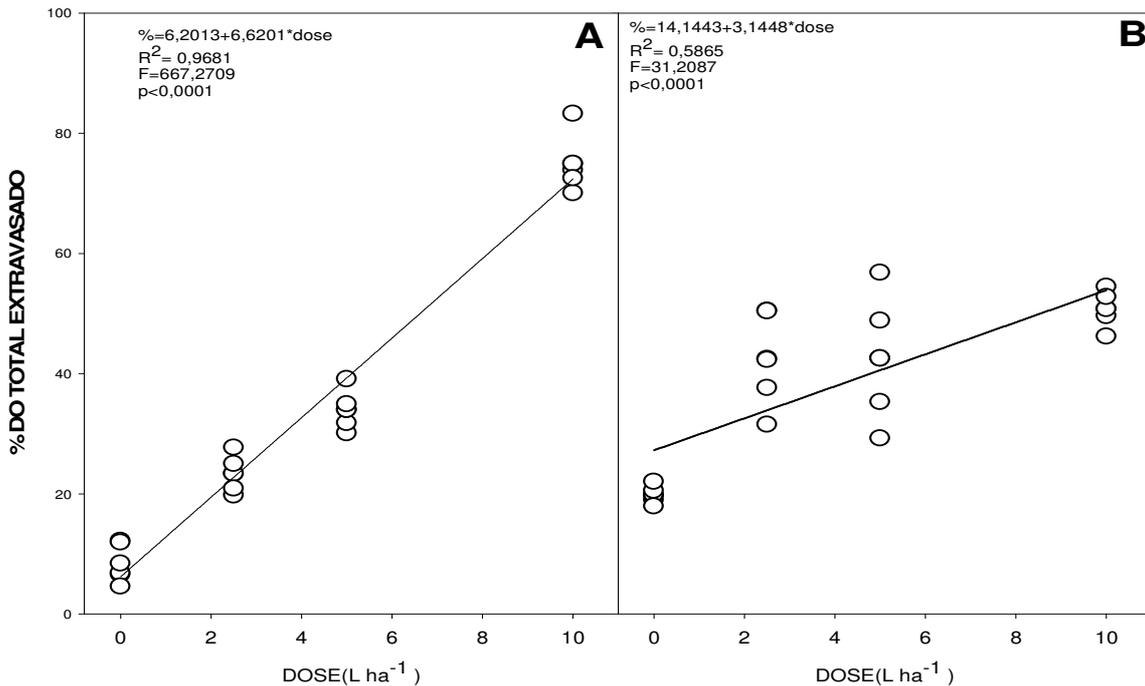
**Tabela 6.** Média do extravasamento de eletrólitos e conteúdo de malonaldeído (MDA) de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância.

DOSE (L.ha <sup>-1</sup> )	<i>E. coccínea</i>		<i>D. horizontalis</i>	
	EXTRV.	MDA	EXTRV.	MDA
0	8,4243	17,33	5,4036	12,1833
2,5	23,335	17,235	32,1051	13,0233
5	33,9803	35,171	32,201	22
10	74,917	31,943	41,9006	14,995
CV (%)	9,74	47,18	26,61	50,61
F	415,95	3,735	26,78	1,95
p<	0,0000	0,0289	0,0000	0,1580

\* EXTRAV= extravasamento de eletrólitos em % do total extravasado; MDA= peroxidação de lipídeos em nmol MDA g<sup>-1</sup> MF.

O extravasamento de eletrólitos apresentou aumentos lineares, significativo, em função das doses do produto aplicado nas espécies *E. coccinea* e *D. horizontalis* (Figura 18). O aumento médio do extravasamento eletrolítico na monocotiledônea foi cerca da metade do observado na dicotiledônea, para cada litro da mistura aplicada.

As membranas biológicas de forma geral são tidas como seletivas, assim permitem a entrada e saída de substâncias conforme o tamanho e natureza da molécula a ser transportada através das mesmas.



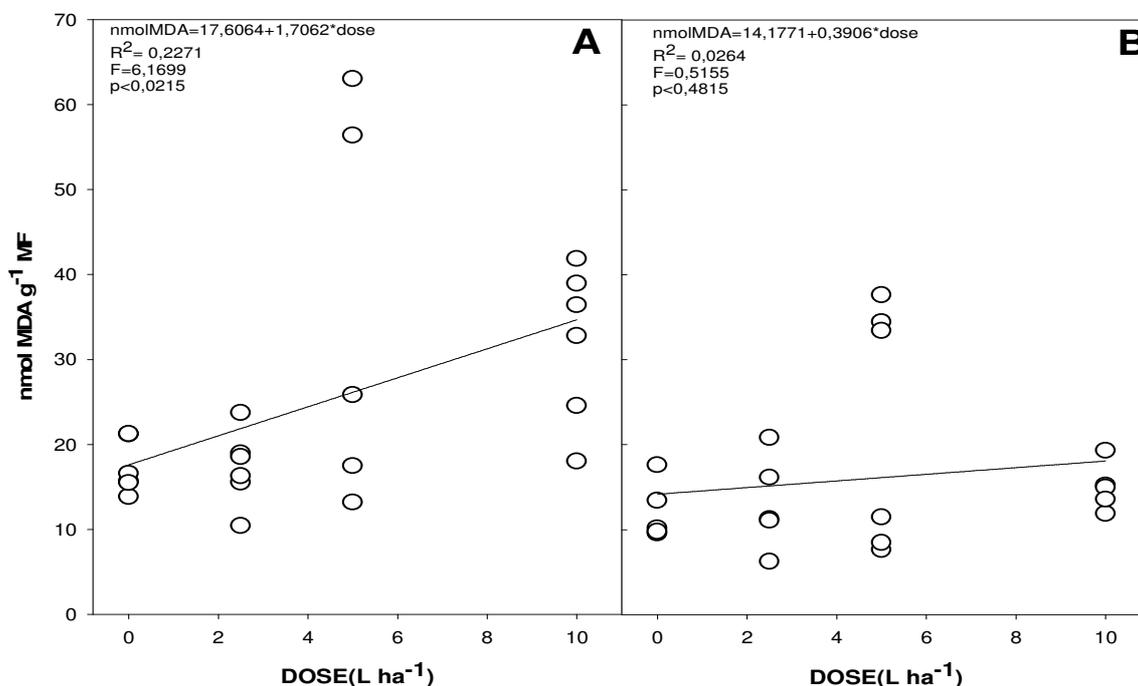
**Figura 18.** Extravasamento de eletrólitos de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.

Então a perda da seletividade pode ser um indicativo de dano nas estruturas dos ácidos graxos insaturados presentes na composição das membranas biológicas das organelas celulares, devido à ação de EROs nessas membranas. Assim pode-se inferir que *D. horizontalis* sofreu menor dano nas membranas celulares do que *E. coccinea*, causado pela mistura de herbicidas. Diversos estresses ambientais podem causar perda da estabilidade de membrana como: frio, altas temperaturas e seca (BAJJI et al., 2001).

O conteúdo de MDA apresentou aumento linear significativo, apenas para *E. coccinea*, em função das doses do herbicida aplicado (Figura 19). O aumento do conteúdo de MDA tem sido relacionado diretamente com a peroxidação de lipídios em várias espécies, devido a fatores ambientais como estresse por frio em plântulas de arroz (KUK et al., 2003) e toxicidade por boro em tomate (CERVILLA et al., 2007), entre outros.

Hassan e Alla (2005) também verificaram aumento nos conteúdos de MDA em plântulas de milho e feijão após a exposição das plantas a herbicida inibidores do FSII. O aumento dos níveis de MDA veio a corroborar com o extravasamento de eletrólitos ocorrido, onde *E. coccinea* apresentou maior extravasamento e maior conteúdo de MDA

evidenciando assim maior dano às membranas devido aos efeitos deletérios da mistura de herbicidas.



**Figura 19.** Peroxidação de lipídios de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina. Os pontos referem-se às determinações realizadas 72 horas após a aplicação do herbicida.

#### 4.6 Área foliar, matéria seca e mortalidade das plantas

As doses da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina) tiveram efeito altamente significativo sobre a área foliar 72 HAA e a matéria seca 25 DAA, nas duas espécies estudadas (Tabela 7).

**Tabela 7.** Média da área foliar e da matéria seca de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* em função da aplicação da mistura de herbicidas (clomazone+ametrina), com resultado da análise de variância.

DOSE (L.ha <sup>-1</sup> )	<i>E. coccinea</i>		<i>D. horizontalis</i>	
	AF	MS	AF	MS
0	23,5773	1,1257	7,2235	0,2719
2,5	9,9752	0,1617	4,271	0,1187
5	13,0396	0,0577	3,258	0,1572
10	9,903	0,0548	1,5803	0,0901
<b>CV (%)</b>	12,55	20,24	13,01	21,34
<b>F</b>	79,93	322,744	119,287	30,334
<b>p&lt;</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

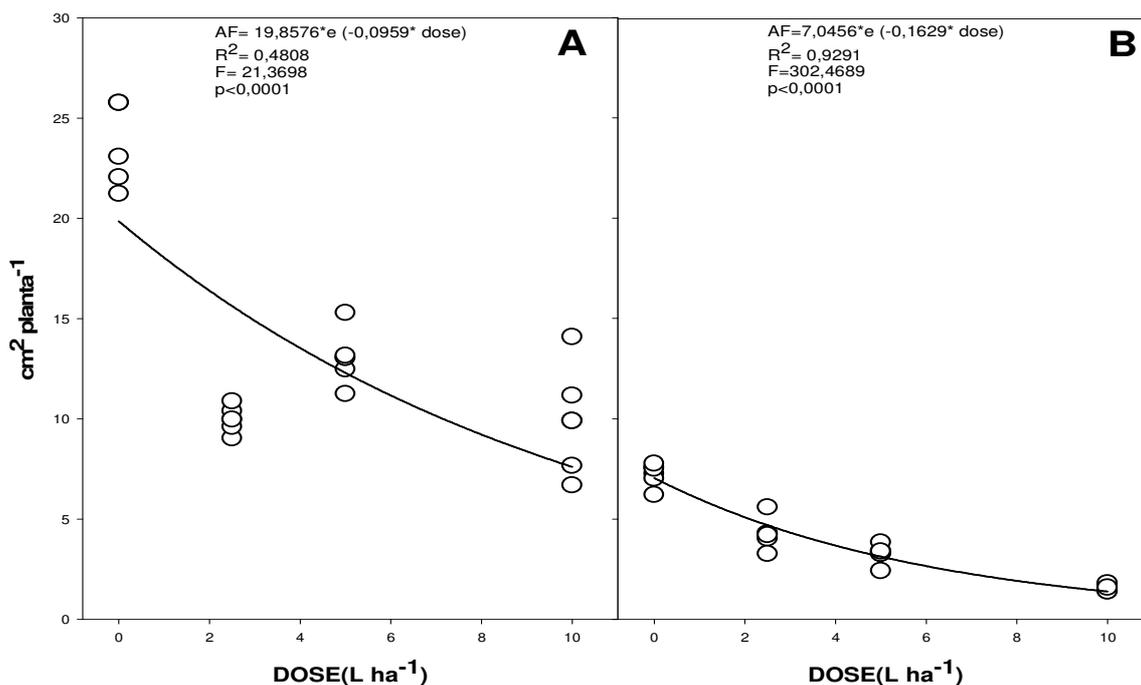
\* AF= cm<sup>2</sup> por planta; MS= g de matéria seca por planta.

A área foliárea das duas espécies estudadas apresentaram decréscimos exponenciais significativos, 72 horas após a aplicação da mistura de herbicidas (Figura 20). *D. horizontalis* apresentou menor taxa de redução ( $0,6652 \text{ cm}^{-2}$  para cada litro do herbicida) em relação a *E. coccinea* ( $1,3545 \text{ cm}^{-2}$  para cada litro do herbicida). As reduções na área foliar observadas com o aumento das doses do herbicida estão relacionadas com a paralisação do crescimento em função dos danos provocados discutidos anteriormente. Além disso, partes dos tecidos foliares sofreram necrose e retração contribuindo também para essa redução.

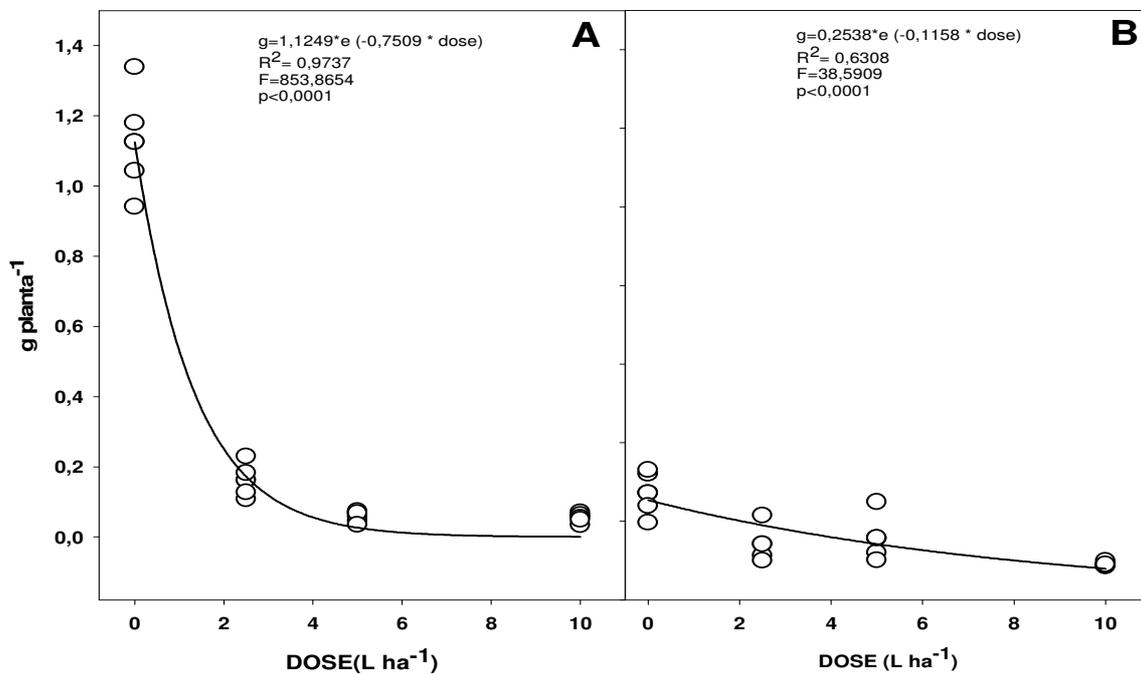
A matéria seca apresentou redução exponencial, significativa pelo teste F, resultante do efeito das doses do herbicida (Figura 21). As espécies estudadas apresentaram respostas diferentes em relação à aplicação da mistura de clomazone+ametrina. A monocotiledônea mostrou menor redução da matéria seca por litro da mistura de herbicidas ( $0,0192 \text{ g planta}^{-1}$ ) comparado com a dicotiledônea ( $0,2628 \text{ g planta}^{-1}$ ).

Em relação ao percentual de plantas mortas e vivas, as doses diferiram entre si de pelo teste do  $\chi^2$ . Porém as espécies tiveram comportamento diferente, enquanto a espécie *E. coccinea* teve sua população eliminada em 100% com o dobro da dose comercialmente recomendada ( $10 \text{ L.ha}^{-1}$ ) (Tabela 3), *D. horizontalis* obteve apenas 53,95% de mortalidade (Tabela 3). Segundo o critério proposto por Lorenzi (2006), para a dose comercial ( $5 \text{ L.ha}^{-1}$ ) *E. coccinea* no presente estudo, pode ser classificada como medianamente suscetível (50 a 85% de controle) e para dose de  $10 \text{ L.ha}^{-1}$  a mesma pode ser classificada como altamente suscetível (mais de 95% de controle). Enquanto que *D. horizontalis*, pode ser classificada como pouco suscetível (menos de 50% de controle) e medianamente suscetível, respectivamente para as doses de 5 e  $10 \text{ L.ha}^{-1}$  conforme o mesmo critério.

O maior percentual de mortalidade de plantas de *E. coccinea* em relação a *D. horizontalis*, em resposta ao herbicida Sinerge EC® pode estar relacionado à baixa capacidade de detoxificação do seus ingredientes ativos, prolongando o efeito deletério da ametrina no FSII e a inibição da síntese de pigmentos fotossintéticos.



**Figura 20.** Área foliar de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) 72 horas após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina.



**Figura 21.** Matéria seca de *Emilia coccinea* (A) e *Digitaria horizontalis* (B) 25 dias após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina.

**Tabela 8.** Média dos percentuais de plantas vivas e mortas de *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis* 25 dias após a aplicação da mistura de herbicidas clomazone+ametrina, com o resultado do teste do  $\chi^2$ .

DOSE(L.ha-1)	<i>Emilia coccinea</i>		<i>Digitaria horizontalis</i>	
	Plantas vivas(%)	Plantas mortas(%)	Plantas vivas(%)	Plantas mortas(%)
2,5	36,25	63,75	87,04	12,96
5,0	16,25	83,75	82,14	17,86
10,0	0	100	46,05	53,95
<b>Total(%)</b>	17,57	82,43	68,82	31,18
$\chi^2$		36,2045		31,341
<b>p&lt;</b>		0,0000		0,0000

O maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos e maior atividade da SOD apresentado pela *D. horizontalis* em relação a *E. coccinea* mesmo após a redução causada pelo efeito sinérgico do herbicida parece ter contribuído para menor redução da área foliar, do acúmulo de matéria seca e da mortalidade, fazendo com essa espécie apresentasse uma maior tolerância às moléculas de clomazone e ametrina. Esses fatos também podem ser confirmados pelo comportamento apresentado por *E. coccinea* nas variáveis de danos de membranas (extravasamento de eletrólitos e MDA), onde essa sofreu maiores danos em relação a *D. horizontalis*.

A base molecular para a resistência e/ou tolerância a uma molécula de herbicida pode ser devido a uma alteração no sítio alvo, aumento no metabolismo do ingrediente ativo, movimento do herbicida para longe do sítio de ação pela compartimentalização ou mecanismos de limpeza dos compostos tóxicos conferindo proteção aos efeitos do herbicida (Reade & Milner., 2004). Estudos futuros devem também contemplar o papel da glutaciona-S-transferase na tolerância de *D. horizontalis*, uma vez que essa enzima pode atuar na conjugação da glutaciona com os ingredientes ativos presentes no Sinerge (READE & MILNER, 2004) e também a atuação de antioxidantes não-enzimáticos para a melhor compreensão do mecanismo antioxidativo dessa espécie na prevenção dos efeitos deletérios da mistura de clomazone+ametrina. Pois os mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos, como os conteúdos de glutaciona e/ou fenóis totais, são complementares, indicando que o não funcionamento de um pode ser compensado ou não pelo outro (MALENČIĆ et al., 2008).

## 5 CONCLUSÕES

Conclui-se que o herbicida Sinerge EC® (clomazone + ametrina) reduz exponencialmente a síntese de pigmentos, a emissão de fluorescência, a área foliar e a matéria seca das espécies *Emilia coccinea* e *Digitaria horizontalis*, com o aumento da dose aplicada.

Os ingredientes ativos contidos no Sinerge EC® aumentam o conteúdo de proteínas solúveis, o extravasamento eletrolítico e os níveis de MDA de forma linear com o aumento das doses. Já a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) diminui, enquanto a da ascorbato peroxidase (APX) não se altera com o aumento da doses de Sinerge EC®.

A monocotiledônea é mais tolerante à mistura de clomazone + ametrina, apresentando menor percentual de mortalidade das plantas, aparentemente por sofrer menor dano de membranas celulares em relação à dicotiledônea.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. Oficinas Gráficas RR Donnelley Moore, 7<sup>a</sup> Ed., São Paulo-SP, Brasil, 2005, 1141p.

ALLA, M.M; BADAWI, A.M; HASSAN, N.M; EL-BATASWISY, Z.M; BADRAN, E.G. Herbicide tolerance in maize is related to increased levels of glutathione and glutathione-associated enzymes. **Acta Physiol Plant**.v.30, p.371–379, 2008.

ALLA, M.M; BADAWI, A.M; HASSAN, N.M; EL-BATASWISY, Z.M; BADRAN, E.G. Effect of metribuzin, butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.90, p.8–18, 2008.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N. ; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**.v.55, p.373–399, 2004.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.50, p.601–639, 1999.

BAJJI, M.; KINET, J.M.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**,v.00, p.1-10, 2001.

BAKER, N.R. Chlorophyll fluorescence a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**. v.59, p.89-113, 2008.

BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. Chlorophyll fluorescence for beginners. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1607–1621, 2004.

BARBAGALLO, R.P.; OXBOROUGH, K.; PALLETT, K.E.; BAKER, N.R. Rapid, non-invasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology**, v. 132, p.485–493, 2003.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43. p.83-116, 1992.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

CAKMAK, I.; HORST, J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine Max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.

CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas. (Apostila 31 páginas), 2001. Disponível em [http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO\\_CCTA\\_1629\\_1112121492.pdf](http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf), acesso em 20/08/2009.

CARRILLO, N.; VALLE, E.M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**. Córdoba. v. 2, n. 2, 2005. Disponível em [www.safv.ar](http://www.safv.ar), acesso em 10/04/2009.

CATUNDA, M.G., FREITAS, S.P., OLIVEIRA, J.G. e SILVA, C.M.M. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 115-121, 2005.

CERVILLA, L. M.; BLASCO, B. A.; RÍOS, J. J.; ROMERO, L.; RUIZ, J. M. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. **Annals of Botany**, v.100, p.747–756, 2007.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; MORQUERO, P.A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S. J. Resistência de *Bidens pilosa* e *B.subalternans* a herbicidas inibidores da ALS .IN: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Eds.). **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: BERthier, 2009. 352p.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; OVEJERO, R.F.L.; NICOLAI, M.; CARVALHO, SAUL J. P. Manejo de Plantas Daninhas na Cultura da Cana-de-açúcar: Novas Moléculas Herbicidas. Disponível em: [www.ipni.net/ppiweb/.../Anais%20Jacob%20Christoffoletti.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/.../Anais%20Jacob%20Christoffoletti.pdf), acesso em 19/08/2009.

DEVINE, M.D.; SHUKLA, A. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. **Crop Protection**, v.19, p.881-889, 2000.

DIAS, A.C.R.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Problemática da ocorrência de diferentes espécies de capim-colchão (*Digitaria spp.*) na cultura da cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 489-499, 2007.

DIAS, N.M.P. Tolerância de espécies de capim-colchão (*Digitaria spp*) a herbicidas na cultura de cana-de-açúcar . **Tese (doutorado)**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2004.

DUARTE, N.F; KARAM, D.; SÁ, N.; CRUZ, M.B.; SCOTTI, M.R.M. Seletividade de herbicidas sobre *Myracrodruon urundeuva* (aroeira). **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 329-337, 2006.

EDWARDS, R.; DIXON, D. P.; WALBOT, V.. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions sickness and in health. **Trends in plant science**, v. 5, n. 5, 2000.

FERHATOGLU, Y.; BARRETT M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 85, 7–14, 2006.

FLINT, H.L, BOYCE, B.R, BEATTIE D.J. Index of injury-a useful expression of freezing injury to plant tissues as determined by the electrolytic method. **Canadian Journal of Plant Science**, v.47, p.229-230, 1966.

GALON,L.; FERREIRA,E.A.; CONCENÇO,G.; SILVA, A.; VARGAS,L. Tolerância de culturas e plantas daninhas a herbicidas.IN: AGOSTINETTO,D.; VARGAS,L. (Eds.). **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: BERthier, 2009. 352p.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

HASSAN, N.M.; ALLA, M. M. N. Oxidative stress in herbicide-treated broad bean and maize plants. **Acta physiologiae plantarum**,v. 27, n. 4., p.429-438, 2005.

HAVAUX, M.; NIYOGI, K.K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 96, p. 8762–8767, 1999.

HENDRY, G. A. F.; GRIME, J. P. **Methods in comparative plant ecology - a laboratory manual**. 1 ed. London: Chapman & Hall, 1993, 252 p.

HOLT, J. S.; POWLES S. B.; HOLTUM J. A. M. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.44, p.203-291, 1993.

JIANG, M.; ZHANG, J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 379, p. 2401-2410, 2002.

KAŇA,R.; SPUNDOVÁ, M.; ILÍK, P.; LAZÁR, D.; KLEM, K.; TOMEK, P.; NAUŠ, J.; PRÁŠIL, O. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **Pesticide Biochemistry and Physiology** v.78, 161–170, 2004.

KUVA, M.A.; GRAVENA, R.; PITELLI, R.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.;ALVES, P.L.C.A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. II.- Capim-Braquiária (*Brachiaria decumbens*). **Planta Daninha**, v. 19, n. 3, p. 223-330, 2001.

KUK, Y.I.; SHIN, J. S.; BURGOS, N. R.; HWANG, T. E.; HA, O.; CHO, B. H.; JUNG, S., GUH, J. O. Antioxidative Enzymes Offer Protection from Chilling Damage in Rice Plants. **Crop Science**, v.43, p.2109–2117, 2003.

KUVA, M.A.; GRAVENA, R.; PITELLI, R.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.;ALVES, P.L.C.A..Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura dacana-de-açúcar. iii – capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). **Planta Daninha**, v.21, n.1, p.37-44, 2003.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil:** terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000, 608 p.

LORENZI, H. **Manual de Identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**, 6<sup>a</sup>ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006, 339p

MALENČIĆ, D. R.; MILADINOVIĆ, J. A.; POPOVIĆ, M. T. Effects of linuron and dimethenamid on antioxidant systems in weeds associated with soybean. **Central European Journal of Biology**., v.3, n.2, p. 155–160, 2008.

MATOUŠKOVA, M.; NAUŠ, J.; FLAŠAROVÁ, M. A long-term response of chlorophyll fluorescence induction to one-shot application of cyanazine on barley plants and its relation to crop yield. **Photosynthetica**, v.37, p.281-294, 1999.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v.7, n.9 p.405-410, 2002.

MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L.H. Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.8, 1997.

MUELLER, C.; SCHWENDER, J.; ZEIDLER, J., LICHTENTHALER, H.K. Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Biochemical Society Transactions**, v.28, p.792–793, 2000.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

NIYOGI, K.K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.50, p.333–359, 1999.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.49, p.249–279, 1998.

NORMAN, M. A.; LIEBI, R.A.; AND WIDHOLM, J. M. Site of clomazone action in tolerant-soybean and susceptible-cotton photomixotrophic cell suspension cultures. **Plant Physiology**, v.94, p.704-709, 1990.

NORMAN, M.A.; LIEBL, R. A.; WIDHOLM, J. M. Uptake and metabolism of clomazone in tolerant-soybean and susceptible-cotton photomixotrophic cell suspension cultures. **Plant Physiology**, 92, 777-784, 1990.

OLIVEIRA, A.R.; FREITAS, S.P. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas em áreas de produção de cana-de-açúcar. **Planta daninha**, v. 26, n. 1, p. 33-46, 2008.

PITELLI, R.A. & DURIGAN, J.C. Terminologia para períodos de controle e de convivência das plantas daninhas em culturas anuais e bianuais. IN: CONGRESSO

BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 15, Belo Horizonte, Resumos. p.37,1984.

PITELLI,R.A. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v.4, n.12, p.1 – 24, 1987.

PROCÓPIO, S.O; SILVA, A.A; VARGAS, L.; FERREIRA, F.A. **Manejo da plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**. Viçosa: UFV, 2003, 153p.

PYON, J. Y. ; PIAO, R. Z.; ROH, S. W. ; SHIN, S. Y. ; KWAK,S. S. Differential levels of antioxidants in paraquat-resistant and –susceptible *Erigeron canadensis* biotypes in Korea. **Weed Biology and Management**, v.4, p.75–80, 2004.

RAO, M.V. ; HALE, B. A.;ORMROD D.P. Amelioration of ozone-Induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. **Plant Physiology**, v.109: p.421-432, 1995.

READE, J.P. H.;L. J. MILNER. A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. **Weed Science**, v.52, p.468–474, 2004.

SILVA,A.A.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA,L.R. Classificação e mecanismo de ação.IN: SILVA,A.A; SILVA J.F (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas.**, 1ª Ed., Editora UFV, p.83-148, 2007.

SILVA,A.A.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA,L.R.; SANTOS,J.B. Biologia de plantas daninhas.IN: SILVA,A.A; SILVA J.F (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas.**, 1ª Ed., Editora UFV, p.18-61, 2007.

SINGH, A.; KAUR, C. Evaluation of Herbicides for the Control of Weeds in Spring Planted Sugarcane. **Sugar Tech**, v. 5, n.4, p. 317 - 318, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fotossíntese: reações luminosas . **Fisiologia Vegetal**, 4<sup>a</sup> ed., p.147-181, Porto Alegre:Artmed, 2009.

TENBROOK, P.L.; TJEERDEMA, R.S. Comparative actions of clomazone on  $\beta$ -carotene levels and growth in rice (*Oryza sativa*) and watergrasses (*Echinochloa* spp). **Pesticide Management Science**, v.61,p.567–571, 2005.

VIDAL, R. A.; FLECK, N. G.; MEROTTO JR., A. Período anterior ao dano no rendimento econômico (PADRE): nova abordagem sobre os períodos de interferência entre plantas daninhas e cultivadas. **Planta Daninha**, v. 23, n. 3, p. 387-396, 2005.

WARWICK, S. I. Herbicide resistance in weedy plants: Physiology and Population Biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v.22, p.95-114, 1991.

WATERS, E.R.; LEE, G.J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p. 325-338, 1996.

ZHU, J.; PATZOLDT, W.L.; RADWAN, O.; TRANEL, P.J.; CLOUGH, S.J. Effects of photosystem-ii-interfering herbicides atrazine and bentazon on the soybean transcriptome. **The Plant Genome**, v.2, n.2, p.191-205, 2009.