

## Seletividade de herbicidas influenciada pelo estado nutricional da cana-de-açúcar<sup>1</sup>

Herbicides selectivity influenced by nutritional status of sugarcane

Danilo Manoel da Silva<sup>2</sup>; Carlos Alberto Mathias Azania<sup>3</sup>; Andréa Aparecida de Padua Mathias Azania<sup>4</sup>; Lucas Ribeiro Beluci<sup>5</sup>; Renan Vitorino<sup>6</sup>; Julio César Garcia<sup>3</sup>

**Resumo** - Para validar a hipótese de que a cana-de-açúcar adequadamente adubada é menos prejudicada pelos herbicidas, foram avaliadas características fitotécnicas e o perfil isoenzimático da  $\alpha$ -esterase e peroxidase nas cultivares de cana-de-açúcar IACSP96-2042 e IACSP95-5094, submetidas a diferentes adubações de plantio e tratadas ou não com herbicidas. No campo foram realizados dois experimentos, um para cada cultivar, em vasos (43 L), utilizando-se do delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos dispostos em fatorial 3 x 3 + 1, com quatro repetições. O primeiro fator constituiu-se por herbicidas: clomazone (1000 g ha<sup>-1</sup>), diuron (1440 g ha<sup>-1</sup>) + hexazinone (396 g ha<sup>-1</sup>) e sulfentrazone (800 g ha<sup>-1</sup>); e o segundo fator pela adubação: doses de NPK (ausência, 20-120-100 e 40-240-200 kg ha<sup>-1</sup>) e a testemunha pela ausência dos fertilizantes e herbicidas. Na aplicação dos herbicidas as plantas apresentavam altura de 20 cm e 3 a 4 folhas. No campo, foram avaliados os sintomas visuais de intoxicação, teor de clorofila total, altura, comprimento de folhas, número de perfilhos e massa fresca e seca das plantas. Em laboratório caracterizou-se o perfil isoenzimático da  $\alpha$ -esterase e peroxidase antes da aplicação dos herbicidas e aos 58 dias após, por eletroforese em gel de acrilamida. IACSP96-2042 foi menos sensível aos herbicidas, sem prejuízo à massa fresca e seca, teor de clorofila total, altura, comprimento de folha e número de perfilhos. As isoformas da peroxidase diferiram em número e intensidade, e da  $\alpha$ -esterase foram alteradas na intensidade das bandas. A IACSP95-5094 foi sensível aos efeitos da intoxicação dos herbicidas por prejudicar na altura, acúmulo de massa fresca e seca, particularmente no tratamento com diuron+hexazinone.

**Palavras-chaves:** *Saccharum* spp., eletroforese, enzima, intoxicação

**Abstract** - In order to validate the hypothesis that sugarcane crop adequately fertilized is less damaged by herbicides, phytotechnical characteristics and isoenzyme profiles of  $\alpha$ -esterase and peroxides in IACSP96-2042 and IACSP95-5094 sugarcane genotypes were evaluated, submitted to different planting fertilizers and treated or no with herbicides. In field conditions, two experiments were conducted, one for each cultivar, in vases (43 L), by using the randomized

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 22/04/2013 e aceito em 23/08/2013.

<sup>2</sup> Graduando em Agronomia pela FAFRAM. Estagiário do Instituto Agrônomo/Centro de Cana. Rod. Prof. Antonio Duarte Nogueira, km 321, CP 206, CEP 14.001-970, Ribeirão Preto, SP < daniloagronomo@hotmail.com >;

<sup>3</sup> PqC Engenheiro Agrônomo, Dr. Instituto Agrônomo/Centro de Cana;

<sup>4</sup> Bióloga, Bolsista Pós Doc Fundag, Instituto Agrônomo/Centro de Cana;

<sup>5</sup> Graduando em Agronomia, FAFRAM. Estagiário PIBIC/CNPq, Instituto Agrônomo/Centro de Cana;

<sup>6</sup> Graduando em Agronomia, FAFRAM. Estagiário PIBIT/CNPq, Instituto Agrônomo/ Centro de Cana.

completely design with treatments arranged in factorial scheme  $3 \times 3 + 1$ , with four replications. The first factor consisted of herbicides: clomazone ( $1000 \text{ g ha}^{-1}$ ), diuron ( $1440 \text{ g ha}^{-1}$ ) + hexazinone ( $396 \text{ g ha}^{-1}$ ) and sulfentrazone ( $800 \text{ g ha}^{-1}$ ) and the second factor was characterized by fertilization: NPK doses (absence, 20-120-100 and 40-240-200  $\text{kg ha}^{-1}$ ) and a control without fertilizers and herbicides. In herbicides application the plants showed 20 cm height and 3 to 4 leaves. In the field, were evaluated the visual symptoms of intoxication, total chlorophyll content, plant height, leaf length, number of tillers and fresh and dry mass of plants. In laboratory conditions, it was characterized the profile of  $\alpha$ -esterase and peroxidase isozyme before herbicide application and 58 days after, by electrophoresis on acrylamide gel. IACSP96-2042 genotype was less sensible to herbicides, without damaging fresh and dry mass, total chlorophyll content, plant height, leaf length and number of tillers. Peroxides' isoforms were different in number and intensity;  $\alpha$ -esterase' isoforms were changed in bands intensity. IACSP95-5094 genotype was sensitive to phytotoxicity effects of herbicides for damaging in height, fresh and dry mass, particularly in the treatment with diuron + hexazinone.

**Keywords:** *Saccharum* spp., electrophoresis, enzyme, intoxication

## Introdução

Os nutrientes e herbicidas são absorvidos pelas folhas ou raízes das plantas, principalmente na forma de ânions (Oliveira et al., 2003; Ferreira et al., 2005). Os nutrientes são vitais ao desenvolvimento das plantas por promoverem o metabolismo, seja pela síntese das enzimas (Pereira et al., 1996), aminoácidos e lipídeos (Junior et al., 2007) ou hormônios (Ferreira et al., 2010).

Entre os macronutrientes primários, o nitrogênio é intensamente utilizado na via da chiquimato para a síntese dos aminoácidos (triptofano, fenilalanina e tirosina), os quais precedem a síntese de proteínas, necessárias à formação da parede celular (Hirel et al. 2007; Maeda & Dudareva, 2012), que permitem a divisão celular e o crescimento dos tecidos das plantas.

O fósforo inorgânico é componente dos nucleotídeos, que por sua vez constituem os ácidos nucleicos (DNA e RNA), fosfolípidos e ATP, além de estar envolvido com a transferência de energia, fosforilação e síntese de proteínas (Smith et al. 2003; Shen et al. 2011). Em cana-de-açúcar, promove o desenvolvimento radicular, perfilhamento, maior número e produção de colmos (Devi et al., 2012).

O potássio altera a concentração do citosol celular e diferentes enzimas são ativadas. Nos cloroplastos, é envolvido com a transferência de elétrons, fixação de  $\text{CO}_2$  pela Rubisco e transporte de metabólitos necessários à fosforilação. Nas folhas das plantas, interfere na abertura e fechamento dos estômatos e proporciona resistência a doenças e pragas (Amtmann et al., 2008).

Ao contrário, os herbicidas suprimem o desenvolvimento das plantas principalmente por inibir enzimas e hormônios (Maeda & Dudareva, 2012). O desbalanço nutricional atenua as rotas metabólicas e a produção e ativação de enzimas (Yahya, 1998), o que pode diminuir os locais de ação dos herbicidas e implicar na seletividade e eficácia dos produtos.

Teores adequados de nitrogênio e fósforo estimulam o desenvolvimento radicular e a maior consequência é o aumento na absorção de substâncias do solo (Devi et al. 2012), inclusive de herbicidas. Araldi et al. (2011) salientaram que as cultivares de uma mesma cultura, ao absorverem maior quantidade de herbicidas, podem apresentar menor tolerância.

A tolerância ou suscetibilidade de uma cultivar ou cultura aos herbicidas também depende da capacidade de seu metabolismo

oxidar, reduzir, hidrolisar, oxigenar as moléculas, bem como conjugá-las com açúcares e aminoácidos e transportá-las ao vacúolo celular (Carvalho et al., 2009). Assim, como o balanço nutricional adequado beneficia qualitativamente todas as rotas metabólicas (Maeda & Dudareva, 2012), evidencia-se que os processos de conjugação das moléculas herbicidas possam ser intensificados, o que pode representar tolerância à planta.

Nas plantas de cana-de-açúcar, o desenvolvimento pode ser prejudicado pelos herbicidas utilizados no manejo das plantas daninhas, que segundo Tiburcio et al. (2012) ocasiona principalmente a intoxicação na parte aérea das plantas. Os herbicidas também podem interferir na marcha de absorção nutricional das plantas, o que para Feng et al. (2005) e Tuffi Santos et al. (2007) pode ser uma interessante variável a ser considerada na experimentação que envolve tolerância aos herbicidas.

Entretanto, ao considerar os benefícios da correta adubação propôs-se a hipótese de que cultivares de cana-de-açúcar adequadamente adubadas com nitrogênio, fósforo e potássio são mais tolerantes aos herbicidas aplicados no manejo de plantas daninhas. Para validação da hipótese objetivou-se estudar a tolerância das cultivares IACSP96-2042 e IACSP95-5094, aos herbicidas clomazone, sulfentrazone e diuron+hexazinone, cultivadas em diferentes adubações de plantio.

## Material e Métodos

Foram conduzidos dois experimentos em ambiente aberto, sendo o primeiro com a cultivar IACSP96-2042 e o segundo com a IACSP95-5094, ambos no período de agosto de 2011 a março de 2012. O clima local tem por característica verão quente e úmido e inverno seco e frio, considerado como tropical de altitude (Cwa), segundo a classificação de Köppen.

As unidades experimentais foram constituídas por vasos de plástico (43 L) com as dimensões de 38,5 cm de altura, 44 e 34 cm de diâmetro superior e inferior, respectivamente, preenchidos com solo de barranco de textura argilosa (555 g kg<sup>-1</sup> de argila, 139 g kg<sup>-1</sup> de areia e 306 g kg<sup>-1</sup> de silte). A análise química indicou 8 g dm<sup>-3</sup> de matéria orgânica; 6,0 de pH (CaCl<sub>2</sub>); 4 mg dm<sup>-3</sup> P; 0,27 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> K; 4,39 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> Ca; 1,38 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> Mg; CTC de 18,05 e V de 33,52 %.

Para elevar a saturação em base (V) para 70% (Espironelo et al., 2010) optou-se por incorporar 0,7 t ha<sup>-1</sup> (15 g vaso) de calcário dolomítico calcinado (48% de CaO; 16% de MgO e PRNT de 124). Utilizou-se para cálculo da quantidade de calcário a ser incorporada para cada parcela a equação: quantidade de calcário=[(43x0,7x1000)/(10000x0,2x1000)]x1000, sendo o volume do vaso (43L), a necessidade de calcário (0,7 t ha<sup>-1</sup>), a área de 1 ha (10000 m<sup>2</sup>), camada arável (0,2m) e fatores de conversão para deixar a unidade final em gramas.

O solo seco ao ar foi depositado em betoneira e homogeneizado com o calcário, posteriormente retornado ao vaso e irrigado. Transcorridos 14 dias, aplicou-se os fertilizantes (28/10/2011), de acordo com o delineamento proposto, incorporando-o até próximo a 20 cm de profundidade no vaso e na sequência fez-se o plantio (28/10/2011) de cinco mini toletes de uma única gema por parcela. Previamente ao plantio os toletes foram imersos em solução com água sanitária 1% por 15 minutos, para desinfecção de possíveis patógenos.

Para cada experimento, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3x3+1, com quatro repetições. A testemunha adicional foi constituída pela ausência dos fertilizantes e herbicidas; no primeiro fator (herbicidas) alocou-se as doses de clomazone (1000 g ha<sup>-1</sup>),

diuron (1440 g ha<sup>-1</sup>) + hexazinone (396 g ha<sup>-1</sup>) e sulfentrazone (800 g ha<sup>-1</sup>) e no segundo fator (adubação) as doses de NPK (ausência, 20-120-100 e 40-240-200 kg ha<sup>-1</sup>). A recomendação comercial de adubação foi realizada de acordo com Espironelo (2010), adotando-se também o dobro e a ausência dos fertilizantes. Como fonte de nutrientes utilizou-se a uréia, superfosfato simples e cloreto de potássio.

Após a brotação e emergência da cana, foi realizado desbaste aos 60 dias do plantio (14/12/2011). O mesmo foi realizado cortando-se as plantas rente ao solo quando se apresentavam em média com 2 a 3 folhas e altura de 14 cm, deixando apenas 1 única planta por unidade experimental. No momento da aplicação (04/01/2012) as plantas apresentavam altura de 20 cm e entre 3 a 4 folhas.

Utilizou-se um pulverizador costal pressurizado, com barra munida com quatro pontas de jato leque (TT110 02), espaçadas de 0,50 m, com pressão constante aproximada de 2,1 kgf cm<sup>-2</sup>, que proporcionou volume de calda de 250 L ha<sup>-1</sup>. No momento da aplicação as condições do ambiente apresentaram-se com temperatura de 24°C, umidade relativa de 74%, nebulosidade de 10% e velocidade do vento de 2,5 km h<sup>-1</sup>.

As variáveis fitotécnicas foram avaliadas antes da aplicação e aos 14, 35 e 58 dias após aplicação (DAA). Para cada época foram avaliados visualmente os sintomas de intoxicação, utilizando-se da escala percentual de notas, onde 0% corresponde à ausência de injúrias e 100% à morte das plantas. O teor de clorofila total foi obtido de três leituras no terço médio da folha +1, utilizando-se do medidor de clorofila, modelo SPAD 502 do fabricante Minolta. A altura das plantas (cm) foi avaliada, medindo a distância do solo até a aurícula da última folha completamente desenvolvida e o comprimento da folha +1, medindo a nervura central com auxílio de régua.

Aos 58 DAA foi obtida a massa fresca e seca dos perfilhos. Primeiramente, as plantas de cada parcela foram cortadas rente ao solo e pesadas para obtenção da massa fresca. Na sequência o material foi colocado em sacos de papel e mantido em estufa de circulação forçada a ar (70°C) até peso constante.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas por pelo teste de Tukey a 1 e 5% de probabilidade.

O perfil isoenzimático da  $\alpha$ -esterase e peroxidase foi obtido a partir de amostras compostas de pedaços (5 cm) do terço médio do limbo foliar de folhas coletadas em cada repetição, antes da aplicação dos herbicidas e aos 58 dias após, de acordo com os procedimentos descritos em Alfenas (2006). Para cada amostra, 0,2 g de tecido foliar foram macerados em cadinho de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido e adicionada a solução tampão de extração 1 (Alfenas, 2006). Em seguida, o extrato foi centrifugado por três minutos a 1500 rpm sendo o sobrenadante transferido para um microtubo.

As isoformas tanto da peroxidase como da  $\alpha$ -esterase foram separadas em um sistema vertical de eletroforese em gel de Acrilamida-bis (30:0,8%) não desnaturante contendo tampão de corrida Tris Glicina (0,05 M, pH 8,0). Para a montagem do gel de poliacrilamida foram utilizados gel separador a 7% e concentrador a 5%. Para a separação foram utilizados uma alíquota de 30  $\mu$ L do extrato de tecido foliar. A eletroforese foi conduzida em geladeira a 4°C para evitar a desnaturação das enzimas, a 200 volts por aproximadamente dez horas.

Para coloração do sistema enzimático  $\alpha$ -esterase, inicialmente os géis foram mantidos recipiente de vidro contendo 100 mL de solução tampão fosfato em agitador tipo "Rocking Platform" Bio Rad a 20 rpm. Em seguida adicionou-se os reagentes  $\alpha$ -naftil acetato e Fast Blue RR. Primeiro foram dissolvidos 0,02 g de  $\alpha$ -naftil acetato em 500

$\mu\text{L}$  de acetona, em seguida esta solução dissolvida em 80 mL de solução tampão fosfato. Após um período de 15 minutos adicionou-se 20 mL da mesma solução tampão fosfato contendo 0,018 g de Fast Blue RR em condição de escuro, até o aparecimento de bandas (adaptado de Alfenas, 2006).

No sistema enzimático peroxidase, inicialmente, o gel foi mantido em recipiente de vidro por 1 hora contendo o fixador acetato de sódio 0,10M pH 5,0 em agitador tipo “Rocking Platform” Bio Rad a 20 rpm. Após esse período, a solução fixadora foi retirada e adicionadas as soluções 1 (100 mg de 3-amino-9-ethyl dissolvidos em 2,5 mL de N,N-dimetilformamida) e 2 (60 mL de tampão peroxidase – acetato de sódio 0,05M pH 5,0; 3 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,10M e 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) mantidas no escuro até revelação das bandas (durante aproximadamente 20 minutos a 1 hora).

Decorrido esse tempo, a solução foi descartada, o gel lavado com água e adicionada à solução descorante por 10 minutos e em seguida incubado em solução secadora, segundo metodologia de Alfenas (2006) durante 12 horas. No dia seguinte, submetido à secagem forçada “Gel Dryer Model 583” na configuração PAGE por 40 minutos a 80 °C.

A leitura das isoenzimas foi realizada com auxílio de um transiluminador, onde os perfis isoenzimáticos dos tratamentos foram comparados aos perfis das respectivas testemunhas em cada época de avaliação. Utilizando-se do software Excel onde reproduziu-se as bandas e suas intensidades, confeccionando o zimograma.

## Resultados e Discussão

Na cultivar IACSP96-2042, tanto nas plantas adubadas quanto na ausência de adubação, os sintomas de intoxicação não ultrapassaram 50% de danos aos 14 DAA (Figura 1), entre os herbicidas estudados.

Para o clomazone, a adubação 40-240-200 kg ha<sup>-1</sup> NPK propiciou os maiores sintomas de intoxicação, em comparação com a

ausência de adubação e com 20-120-100 kg ha<sup>-1</sup> de NPK. Já aos 35 DAA, os valores de intoxicação foram reduzidos pela metade para o clomazone. Os resultados sugerem tolerância às plantas, devido à recuperação dos sintomas. Segundo Carvalho et al. (2009) a tolerância de uma cultivar ou cultura aos herbicidas depende da capacidade de seu metabolismo oxidar, reduzir, hidrolisar, oxigenar as moléculas, bem como conjugá-las com açúcares e aminoácidos e transportá-las ao vacúolo celular.

O clomazone causou sintomas de albinismo nas folhas das plantas, com manchas brancas até aos 35 DAA, o que segundo Ferreira et al. (2010), devem-se a inibição da síntese de carotenóides. Zera et al. (2011), observaram em vários genótipos de cana-de-açúcar uma maior intoxicação para o uso do clomazone aos 15 dias após aplicação.

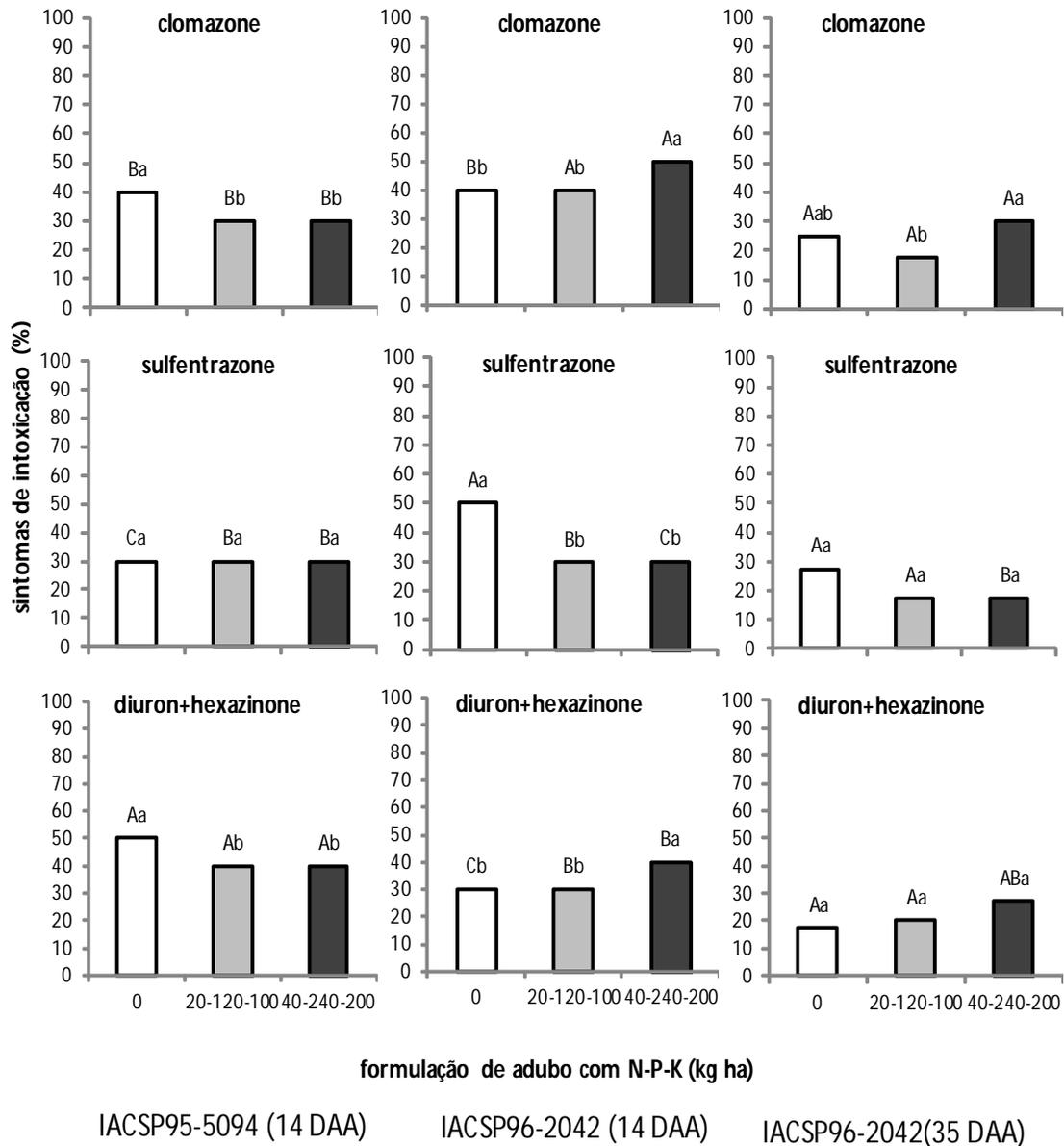
Ainda na cultivar IACSP96-2042, na utilização do sulfentrazone, a testemunha diferiu dos demais tratamentos por apresentar o maior sintoma de intoxicação aos 14 DAA, (Figura 1). Entretanto, o valor máximo foi de 50%. Aos 35 DAA, as notas atribuídas aos sintomas de intoxicação diminuíram pela metade. Para Ohmes et al. (2000) a degradação da molécula do sulfentrazone está diretamente relacionada com a disponibilidade de água, que pode ter sido favorecida pelas irrigações diárias realizadas nos vasos.

O diuron+hexazinone, assim como ocorreu com o clomazone, também apresentou os maiores sintomas de intoxicação associados com a formulação 40-240-200 kg ha<sup>-1</sup> de NPK aos 14 DAA, diferindo da ausência de adubação e de 20-120-100 kg ha<sup>-1</sup> de NPK (Figura 1). Aos 35 DAA constatou-se uma capacidade de recuperação (sintomas de intoxicação chegaram ao máximo de 27%) porque não mais se observou diferenças significativas entre o tratamento diuron+hexazinone com a testemunha e os níveis de adubação. Souza et al. (2009) também relataram uma grande capacidade de

recuperação dos sintomas de intoxicação em cana-de-açúcar para o diuron+hexazinone.

Aos 58 DAA, a cultivar IACSP96-2042 não apresentaram mais injúrias na parte aérea para qualquer tratamento estudado, demonstrando ser tolerante aos herbicidas mesmo para nos tratamentos com ausência de

adubação. O teor de clorofila e a altura da planta não foram expressivos e os acúmulos de massa fresca, seca e números de perfilhos mensurados até aos 35 DAA não foram prejudicados pela interação entre herbicidas e nutrição (Tabela 1).



**Figura 1.** Sintomas de intoxicação nas plantas de cana-de-açúcar aos 14 e 35 DAA. Instituto Agrônomo, 2013. Letras maiúsculas comparam-se entre herbicidas (vertical) e minúsculas comparam-se entre as doses de adubo (horizontal).

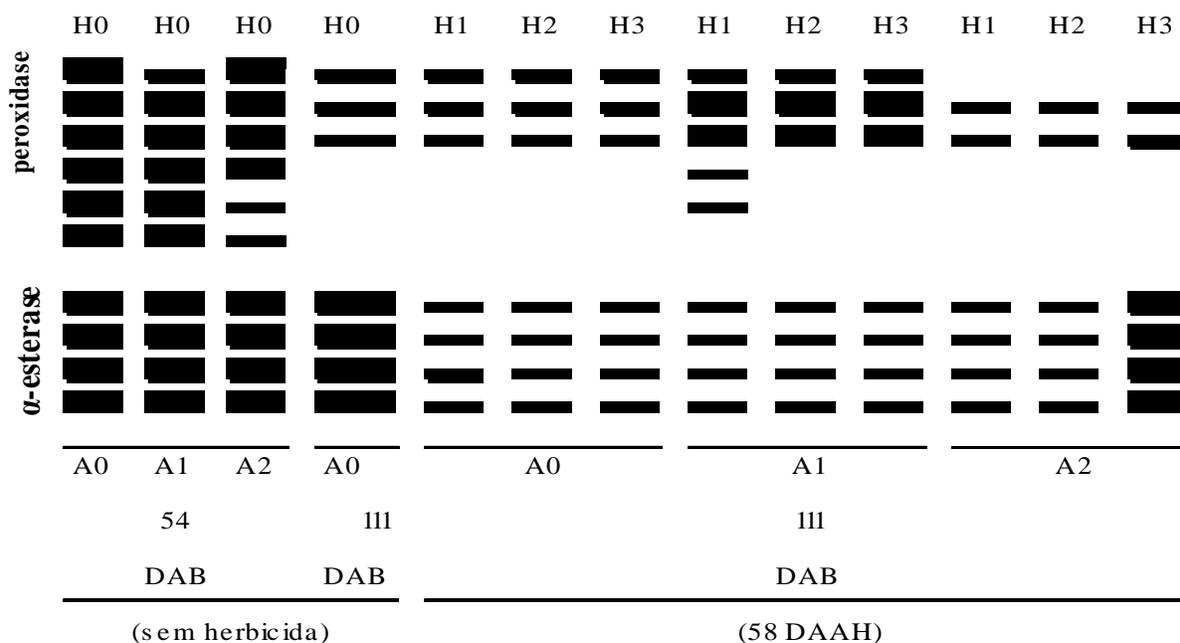
**Tabela 1.** Teor de clorofila, altura (cm), massa fresca e seca (g) e número de perfilhos das plantas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes herbicidas e adubações de NPK. Instituto Agrônomo, 2012.

	Herbicidas	N-P-K (kg ha <sup>-1</sup> )					
		IACSP95-5094			IACSP94-2042		
		0	20-120-100	40-240-200	0	20-120-100	40-240-200
Teor Clorofila (14 DAA)	clomazone	5,61 Aa (31,00)	6,12 Aa (37,00)	6,04 Aa (35,93)	5,78 Aa (32,99)	6,24 Aa (38,46)	5,96 Aa (35,08)
	sulfentrazone	5,31 Aa (27,73)	5,57 Aa (30,55)	5,94 Aa (34,80)	4,85 Aa (23,00)	6,15 Aa (37,31)	6,30 Aa (39,16)
	diuron+hexazinone	5,45 Aa (29,15)	6,05 Aa (36,15)	5,78 Aa (32,93)	5,20 Aa (26,53)	5,92 Aa (34,61)	4,54 Aa (20,08)
Teor Clorofila (35 DAA)	clomazone	5,36 Aa (28,48)	4,25 ABa (17,78)	3,32 Bb (11,20)	4,32 Aa (18,13)	4,17 Aa (16,90)	3,84 Aa (14,28)
	sulfentrazone	4,22 Aa (18,55)	4,60 Aa (20,70)	3,80 A ab (15,86)	4,97 Aa (24,21)	4,18 Aa (16,95)	4,50 Aa (19,80)
	diuron+hexazinone	4,69 Aa (21,55)	3,90 Aa (14,68)	4,89 Aa (23,60)	4,35 Aa (18,41)	5,41 Aa (28,78)	4,87 Aa (23,23)
Teor Clorofila (58 DAA)	clomazone	5,36 Aa (28,18)	5,00 Aa (24,45)	5,16 Aa (26,13)	4,94 Aa (23,89)	5,65 Aa (31,38)	5,27 Aa (27,24)
	sulfentrazone	5,16 Aa (26,08)	5,19 Aa (26,40)	4,94 Aa (23,95)	4,94 Aa (23,86)	5,09 Aa (25,40)	4,62 Aa (20,89)
	diuron+hexazinone	4,25 Bb (17,53)	4,50 Bb (19,70)	5,15 Aa (25,98)	4,72 Aa (21,82)	5,26 Aa (27,14)	4,88 Aa (23,20)
Altura da Planta (14 DAA)	clomazone	3,35 Aa (10,75)	4,80 Aa (22,50)	5,07 Aa (25,25)	5,00 Aa (24,00)	5,85 Aa (33,75)	5,45 Aa (29,25)
	sulfentrazone	4,10 Aa (16,25)	5,36 Aa (28,25)	5,61 Aa (31,00)	4,87 Aa (23,25)	5,17 Aa (26,25)	5,34 Aa (28,00)
	diuron+hexazinone	4,50 Aa (19,75)	4,66 Aa (21,25)	5,58 Aa (30,50)	4,82 Aa (22,75)	5,00 Aa (24,50)	5,24 Aa (27,00)
Altura da Planta (35 DAA)	clomazone	3,90 Bb (15,00)	5,54 Ab (30,25)	5,93 Aa (34,75)	5,77 Aa (32,75)	6,75 Aa (45,00)	6,32 Aa (39,50)
	sulfentrazone	4,63 Bab (21,25)	6,39 Aa (40,50)	6,08 Aa (36,75)	5,34 Aa (28,00)	5,81 Aa (33,25)	5,74 Aa (32,00)
	diuron+hexazinone	4,78 Ba (22,50)	4,83 Bb (23,00)	5,95 Aa (35,00)	4,80 Aa (22,50)	5,29 Aa (27,50)	5,29 Aa (27,50)
Altura da Planta (58 DAA)	clomazone	4,11 Ba (16,75)	6,18 Aa (38,00)	6,93 Aa (47,50)	6,54 Aa (42,25)	7,79 Aa (60,25)	7,02 Aa (48,75)
	sulfentrazone	4,94 Ba (24,50)	7,10 Aa (50,00)	6,50 Aa (42,50)	5,50 Aa (29,75)	6,14 Aa (37,25)	6,10 Aa (36,75)
	diuron+hexazinone	4,26 Ba (17,75)	4,54 Bb (20,25)	6,44 Aa (41,25)	4,97 Aa (24,25)	5,60 Aa (30,75)	5,79 Aa (33,00)
Massa Fresca	clomazone	5,42 Ba (32,70)	14,54 Aa (212,94)	18,73 Aa (350,46)	13,95 Aa (193,99)	25,66 Aa (657,99)	17,94 Aa (321,43)
	sulfentrazone	8,64 Ba (87,76)	18,64 Aa (372,86)	15,13 Aa (238,57)	9,17 Aa (83,52)	11,20 Aa (124,83)	14,52 Aa (210,44)
	diuron+hexazinone	7,49 Ba (58,04)	8,66 ABb (75,78)	13,82 Aa (194,02)	8,08 Aa (64,85)	10,95 Aa (119,34)	12,17 Aa (147,65)
Massa Seca	clomazone	3,29 Ba (11,37)	8,84 Aa (78,68)	10,53 Aa (110,46)	7,73 Aa (59,26)	12,88 Aa (165,34)	9,92 Aa (97,85)
	sulfentrazone	5,12 Ba (30,62)	10,67 Aa (118,22)	8,88 Aab (80,31)	5,32 Aa (27,75)	6,95 Aa (47,76)	7,82 Aa (60,61)
	diuron+hexazinone	4,55 Ba (22,26)	5,18 ABb (26,53)	7,28 Ab (53,08)	4,60 Aa (20,63)	6,00 Aa (35,38)	6,50 Aa (41,73)
N° Perfilho	clomazone	1,73 Aa (2,50)	2,96 Aa (8,25)	2,78 Aa (7,25)	2,24 Aa (4,50)	3,00 Aa (8,50)	2,55 Aa (6,00)
	sulfentrazone	1,94 Aa (3,25)	2,78 Aa (7,25)	2,74 Aa (7,00)	2,35 Aa (5,00)	2,50 Aa (5,75)	2,35 Aa (5,00)
	diuron+hexazinone	2,35 Aa (5,00)	2,65 Aa (6,50)	2,29 Aa (4,75)	2,12 Aa (4,00)	2,35 Aa (5,00)	2,12 Aa (4,00)

\*Letras maiúsculas compara-se na linha e minúsculas nas colunas; dados entre parênteses correspondem aos originais; dados transformados (vx + α) com valor de α = 1

De acordo com as características fitotécnicas, a cultivar IACSP96-2042 foi tolerante aos herbicidas por apresentar crescimento e acúmulo de massa seca similar em todos os tratamentos aos 58 DAA. O não comprometimento das características fitotécnicas até aos 58 DAA pode estar relacionado à não alteração na quantidade e intensidade das isoformas no perfil isoenzimático da  $\alpha$ -esterase e das poucas

alterações de intensidade nas isoformas da peroxidase (Figura 2), após a aplicação dos herbicidas. Campos et al. (2003) mencionaram que a  $\alpha$ -esterase intensificam suas isoformas em detrimento ao estímulo ambiental recebido. Ao contrário, Hahlbrock & Scheel (1989) observaram que sobre estresse ambiental a planta produz substâncias fenólicas que podem alterar a intensidade e número de isoformas de uma dada enzima.



**Figura 2.** Zimogramas da  $\alpha$ -esterase e peroxidase obtidos para a cv IACSP96-2042. H0–ausência de herbicidas; DAB (dias após brotação das plantas); DAAH (dias após aplicação dos herbicidas); H1–clomazone (1000 g ha<sup>-1</sup>); H2–sulfentrazone (800 g ha<sup>-1</sup>); H3–diuron (1440 g ha<sup>-1</sup>)+hexazinone (396 g ha<sup>-1</sup>); A0–ausência, A1–20-120-100 e A2–40-240-200 kg ha<sup>-1</sup>. Instituto Agrônômico, 2012

A maior intensidade das bandas é indício de maior atividade enzimática, particularmente da  $\alpha$ -esterase, poderia posteriormente ter influenciado na metabolização dos herbicidas. Entretanto, mesmo as plantas de cana-de-açúcar apresentando ausência de sintomas de intoxicação e nenhum prejuízo ao crescimento e acúmulo de massa seca aos 58 DAA (Tabela 1), ainda se observou que as isoformas da  $\alpha$ -esterase apresentavam menor intensidade nos

tratamentos com os herbicidas. Exceção ocorreu no tratamento envolvendo o dobro da recomendação de fertilizante para o herbicida diuron+hexazinone, mostrando maior intensidade enzimática (Figura 2). A literatura é escassa quanto aos estudos que envolvem herbicidas, doses de adubo e enzimas. Mas, diuron+hexazinone aplicado em pós-emergência de *P. maximum* promoveu sinergismo no transporte de elétrons no fotossistema II (Giotto et al., 2012). Assim,

sugere-se que o tratamento também possa interferir na intensidade das enzimas relacionadas ao alívio do estresse oxidativo, expressa no perfil enzimático proposto no estudo, assim como observado pelos autores quanto ao transporte de elétrons.

Para cultivar IACSP95-5094 os sintomas de intoxicação foram similares aos da IACSP96-2042, não ultrapassando os 50% (Figura 1). Verificou-se que diuron+hexazinone e clomazone causaram mais injúrias na ausência de adubação. Com a utilização do clomazone, na ausência de adubação aos 14 DAA, ocorreram os maiores sintomas de intoxicação, cerca de 40%, diferindo da presença do adubo, com 30% em ambas as quantidades. Os sintomas observados incluíam manchas cloróticas nas folhas das plantas. O clomazone pode ter sido influenciado pela matéria orgânica (baixo teor na análise do solo) e argila do solo (Loux & Slife, 1989).

Para o sulfentrazone, aos 14 DAA foi indiferente a ausência ou presença da adubação para a cultivar IACSP95-5094, pois não foram observadas diferenças entre os tratamentos quanto aos sintomas de intoxicação. Tal fato explica-se devido a alta solubilidade do sulfentrazone (490 ppm) associada a irrigação diária dos vasos, proporcionando a lixiviação total e/ou parcial do produto (Ohmes et al., 2000) e assim ter contribuído com os resultados.

O diuron+hexazinone propiciou os maiores sintomas de intoxicação na ausência de adubação aos 14 DAA (cerca de 50%), diferindo quanto à utilização de 20-120-100 e 40-240-200 kg ha<sup>-1</sup> de NPK.

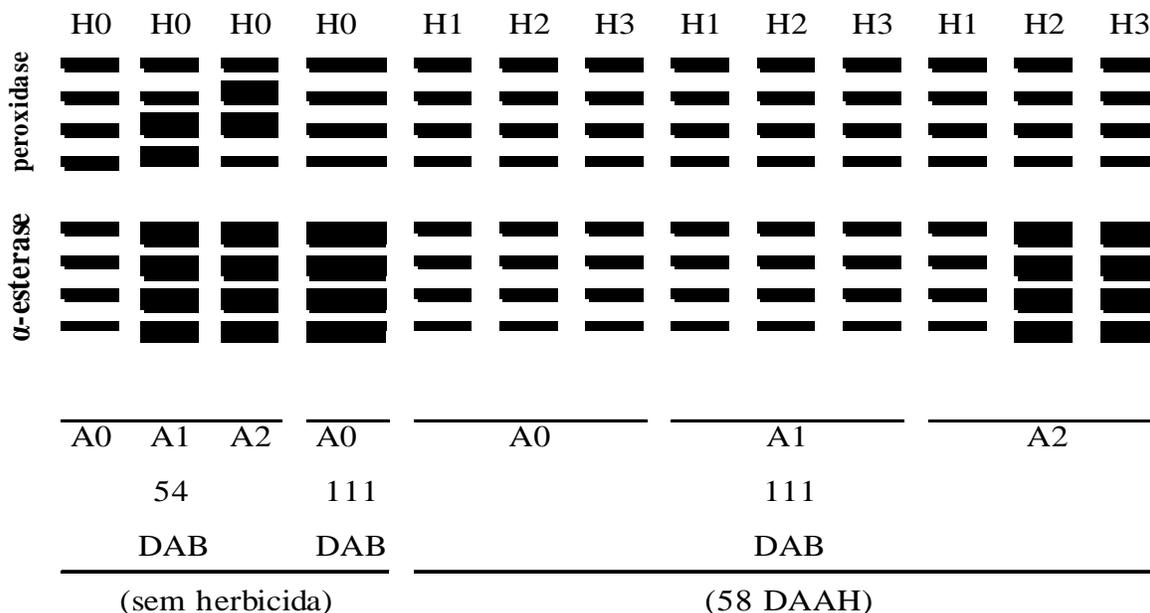
Aos 35 DAA não foram observadas qualquer diferença ou interação entre os herbicidas e a adubação (dados não apresentados), com o valor máximo de 25% quanto aos sintomas de intoxicação. Entretanto, aos 58 DAA não foram mais detectados sintomas de danos nas plantas da cultivar, mas

o crescimento foi prejudicado nos tratamentos com ausência da adubação NPK. A altura das plantas aos 35 e 58 DAA foi menor em todos os tratamentos herbicidas sem a presença da adubação química. Nos tratamentos com diuron+hexazinone a menor altura também foi observada mesmo quando se aplicou a adubação na dose recomendada, sendo que apenas não se observou prejuízo nos tratamentos herbicidas envolvendo a maior dose da adubação (Tabela 1). Resultados similares foram encontrados por Azania et al. (2006), ao observarem que a mistura pronta de diuron+hexazinone reduziu a altura da cana-de-açúcar aos 45 DAA.

Foi observado que nos tratamentos com níveis de adubação o acúmulo de massa fresca e seca foi menor quando aplicado também diuron+hexazinone, apresentando acusando menor tolerância das cultivares de cana (Tabela 1). Os resultados corroboram com Ferreira et al. (2010), os quais observaram que a massa fresca e altura da variedade CTC 5 foram drasticamente reduzidas com uso do diuron+hexazinone. O resultado pode estar relacionado com o mecanismo de ação do herbicida, que ao atingir o fotossistema II proporciona escassez de carboidratos e a posterior paralisação no crescimento da planta.

De acordo com as variáveis fitotécnicas, a cultivar IACSP95-5094 não foi tolerante aos herbicidas independente da adubação NPK utilizada no plantio da cultura. Os prejuízos no acúmulo da massa seca e fresca no tratamento com diuron+hexazinone aos 58 DAA (Tabela 1) pode ser apontado como a maior evidência da menor seletividade.

No metabolismo das plantas também aos 58 DAA, constatou-se que as adubações não influenciaram a intensidade e número de isoformas da peroxidase. O perfil isoenzimático da peroxidase (Figura 3) ficou similar à testemunha, sem alteração na intensidade e número das isoformas para todos os herbicidas e doses da adubação.



**Figura 3.** Zimogramas da  $\alpha$ -esterase e peroxidase obtidos para a cv IACSP95-5094. H0–ausência de herbicidas; DAB (dias após brotação das plantas); DAAH (dias após aplicação dos herbicidas); H1–clomazone (1000 g ha<sup>-1</sup>); H2–sulfentrazone (800 g ha<sup>-1</sup>); H3–diuron (1440 g ha<sup>-1</sup>)+hexazinone (396 g ha<sup>-1</sup>); A0–ausência, A1–20–120–100 e A2–40–240–200 kg ha<sup>-1</sup>. Instituto Agrônomo, 2012.

As isoformas da  $\alpha$ -esterase apresentaram-se com menor intensidade em todos os tratamentos herbicidas, exceto para sulfentrazone e diuron+hexazinone associados à maior quantidade de NPK. A menor intensidade das isoformas da  $\alpha$ -esterase pode ser um indicativo de que a atividade enzimática esteja diminuída, devido ainda a presença de herbicidas no metabolismo, embora não observado relatos similares na literatura. À medida que se aumentou a quantidade da adubação, a intensidade das isoformas retomaram ao padrão da testemunha nos tratamentos com sulfentrazone e diuron+hexazinone. Este resultado sugere, ainda, alguma possível interferência dos herbicidas sulfentrazone e diuron+hexazinone no metabolismo da planta.

### Conclusões

A IACSP96-2042 apresentou menor sensibilidade aos herbicidas, sem prejuízo à massa fresca e seca, teor de clorofila total,

altura, comprimento de folha e número de perfilhos. As isoformas da peroxidase diferiram em número e intensidade, e da  $\alpha$ -esterase foram alteradas na intensidade das bandas. A IACSP95-5094 foi sensível aos efeitos da intoxicação dos herbicidas por prejudicar na altura, acúmulo de massa fresca e seca, particularmente no tratamento com diuron+hexazinone.

### Referências

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos.** In: ALFENAS, A.C. (Ed). 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. 627p.
- AMTMANN, A.; TROUFFLARD, S.; ARMENGAUD, P. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. **Physiologia Plantarum**, v.133. n.1, p.682–691, 2008.

- ARALDI, R. et al. Avaliação da intoxicação de cultivares de cana-de-açúcar e *I. grandifolia* ao amicarbazone. **Planta Daninha**, v.29, n.4, p.869-875, 2011.
- AZANIA, C.A.M. et al. Seletividade de herbicidas. III – aplicação de herbicidas em pós-emergência inicial e tardia da cana-de-açúcar na época da estiagem. **Planta Daninha**, v.24, n.3, p.489-495, 2006.
- CAMPOS, A.D.; SILVEIRA, E.M.L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas-RS: EMBRAPA, 2003. (Comunicado Técnico, 87)
- CARVALHO, S.J.P. et al. Review Herbicides selectivity differential metabolism: considerations for reducing crop damages. **Scientia Agricola**, v.66, n.1, p.136-142, 2009.
- CONCENÇO, G.; GALON, L. Plasmodesmata: symplastic transport of herbicides within the plant. In: SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. (Eds.). **Herbicides - theory and applications**. Rijeka: Intech, 2011. p.455-470.
- DEVI, T.C. et al. Effect of sources and levels of phosphorus with zinc on yield and quality of sugarcane. **Sugar Tech**, v.14, n.2, p.195-198, 2012.
- ESPIRONELLO, A. et al. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Eds.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. rev. e atual. Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 1997. p.237-239. (Boletim Técnico, 100).
- FENG, P.C.C. et al. Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate – resistant wheat and soybean. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (Pnas)**, v.102, n.48, p.17290-17295, 2005.
- FERREIRA, E.A. et al. Sensibilidade de cultivares de cana-de-açúcar à mistura trifloxysulfuron-sodium+ametryn. **Planta Daninha**, v.23, n.1, p.93-99, 2005.
- FERREIRA, R.R. et al. Tolerância diferencial de variedades de cana-de-açúcar a estresse por herbicidas. **Bragantia**, v.69, n.2, p.395-404, 2010.
- GIROTTO, M. et al. Efeito do hexazinone isolado e em mistura na eficiência fotossintética de *Panicum maximum*. **Planta Daninha**, v.30, n.2, p.341-347, 2012.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, n.1, p.347-369, 1989.
- HIREL, B. et al. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.9, p.2369-2387, 2007.
- LOUX, M.M.; SLIFE, F.W. Availability and persistence of imazaquin, imazethapyr, and clomazone in soil. **Weed Science**, v.37, n.2, p.259-267, 1989.
- MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Plant Biology**, v.63, n.1, p.73-105, 2012.
- MARSARO JÚNIOR, A.L. et al. Influência de diferentes sistemas de adubação na composição nutricional do milho *Zea mays L.* (Poaceae) e seus efeitos no ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) no produto armazenado. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n.1, p.51-64, 2007.
- OHMES, G.A.; HAYES, R.M.; MUELLER, T.C. Sulfentrazone dissipation in a Tennessee soil. **Weed Technology**, v.14, n.1, p.100-105, 2000.
- OLIVEIRA, P.P.A. et al. Liming and fertilization to restore degraded *Brachiaria*

*decumbens* pastures grown on an entisol. **Scientia Agricola**, v.60, n.1, p.125-131, 2003.

PEREIRA, E.G. et al. Efeitos da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.1, p.59-63, 1996.

SHEN, J. et al. Phosphorus dynamics: from soil to plant. **Plant Physiology**, v.156, n.1 p.997-1005, 2011.

SMITH, F.W. et al. Phosphate transport in plants. **Plant and Soil**, v.248, n.1 p.71-83, 2003.

SOUZA, J.R. et al. Tolerância de cultivares de cana-de-açúcar a herbicidas aplicados em pós-emergência. **Bragantia**, v.68, n.4, p.941-951, 2009.

TIBURCIO, R.A.S. et al. Crescimento de mudas de clones de eucalipto submetidos à deriva simulada de diferentes herbicidas. **Revista Árvore**, v.36, n.1, p.65-73, 2012.

TUFFI SANTOS, L.D. et al. Glyphosate sobre a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto. **Planta Daninha**, v.25, n.1, p.139-147, 2007.

YAHYA, A. Salinity effects on growth and on uptake and distribution of sodium and some essential mineral nutrients in sesame. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, n.7, p.1439-1451, 1998.

ZERA, F.S. et al. Tolerância de diferentes cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) a herbicidas. **Planta Daninha**, v.29, n.3, p.591-599, 2011.