

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE METRIBUZIN E CLOMAZONE COMO  
MODELO PARA O ESTUDO DO SINERGISMO ENTRE HERBICIDAS**

Nelson Diehl Kruse

Engenheiro Agrônomo, Mestre (UFRGS)

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de doutor em  
Fitotecnia, Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre - RS, Brasil

Setembro, 2002



**Dedico este trabalho a Eddy Diehl Kruse (*in memoriam*) e Wallace Otto Kruse, meus Pais e a Sônia e Paula, todos, as pessoas mais importantes na minha vida**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Ribas Antonio Vidal, pelos ensinamentos, estímulo, lição de dinamismo e paciência.

Ao Professor Nilson Gilberto Fleck, por suas contribuições, ensinamentos e pelo exemplo de postura profissional a ser seguido.

Aos membros do Comitê de Orientação, Professores Cláudio Mário Mundstock e Carla Dalmaz pelas contribuições prestadas na melhoria deste trabalho. Ao Professor João Riboldi por suas contribuições e pela orientação nas análises estatísticas. Ao Dr. Erivelton Scherer Roman (Embrapa Trigo) pelas contribuições e participação da Comissão Examinadora da Tese.

Ao colega Michelangelo Müzzel Trezzi, que além de grande companheiro de estudos e trabalhos, foi parceiro e amigo em todos momentos do curso.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, em especial aos colegas Alvadi Balbinot Jr., Dirceu Agostinetto, Gilber Argenta, João Pires, Mário Bianchi, Mauro Rizzardi, Miguel Weiss Ferri, Paulo Henrique de Oliveira e Vitor Spader, pelo companheirismo e amizade. Aos bolsistas de iniciação científica Cristiano Schacker dos Anjos, Esteban Mendez, Israel R. Silva, Paulo Gomes e Rafael Franke pelo auxílio.

Aos colegas Professores e Servidores Técnico-administrativos do Departamento de Defesa Fitossanitária (CCR/UFSM), pelas tarefas que assumiram em função de minha ausência, e que tem sido minha segunda família.

À UFSM, PICDT e CAPES pela oportunidade e apoio financeiro para realização do curso.

Ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, pela possibilidade de realização do curso, na pessoa de seu Coordenador, Professor José Antonio Barbosa Neto e da Secretária Marisa Carvalho Bello que, com incansável abnegação, conduz a estrutura acadêmica do curso.

À Faculdade de Agronomia da UFRGS e Departamento de Plantas de Lavoura pelo apoio e cedência de suas instalações. Aos Professores e Servidores técnico-administrativos do Departamento, em especial ao servidor José Miguel Lenzi (EEA/UFRGS).

Ao Laboratório de Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica da UFRGS, em especial à Professora Carla Dalmaz, pelo treinamento na análise de TBA.

# ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE METRIBUZIN E CLOMAZONE COMO MODELO PARA O ESTUDO DO SINERGISMO ENTRE HERBICIDAS<sup>1</sup>

Autor: Nelson Diehl Kruse  
Orientador: Ribas Antonio Vidal

## RESUMO GERAL

Hipotetiza-se que haja sinergismo na associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides, pelos seus mecanismos de ação específicos. Com o objetivo de demonstrar a existência de sinergismo na associação de herbicidas pertencentes a estes dois grupos foram conduzidos trabalhos em laboratório, casa-de-vegetação e a campo. Em laboratório avaliou-se a interação de metribuzin e clomazone através da estimativa do estresse oxidativo gerado pela associação, em plantas de girassol, com a determinação dos níveis de malondialdeído e extravasamento eletrolítico. Em casa-de-vegetação, plantas de girassol foram tratadas com os mesmos herbicidas e foram tomadas amostras para eletromicrografias que produziram visualização dos cloroplastos tratados e não tratados. Também foram aplicados tratamentos a fim de permitir a formação de curvas de resposta às doses dos mesmos herbicidas, com a representação das doses causadoras de 50% de efeito em isobologramas. Avaliou-se também o impacto da associação metribuzin e clomazone sobre as relações de interferência entre soja e girassol, pelo delineamento dialélico. A campo foram conduzidos experimentos de controle de *Bidens pilosa* infestando a cultura da soja com os herbicidas metribuzin e clomazone. Para avaliar a seletividade das associações, conduziu-se experimentos com a cultura da soja, onde testou-se metribuzin e clomazone e com a cultura do milho, testando-se atrazine e isoxaflutole. Nos trabalhos com malondialdeído, extravasamento eletrolítico e eletromicrografias, obteve-se sinergismo valendo-se do método de Colby. No ensaio de curvas de resposta, a variável massa seca apresentou probabilidade de sinergismo de 0,90 em uma combinação. No dialélico, a associação dos produtos reduziu a tolerância da soja ao metribuzin e à sua associação com clomazone. No controle de *B. pilosa*, as variáveis percentual de cobertura e controle demonstraram sinergismo pelo método de Limpel. Na avaliação de seletividade, não se observou nenhum dano resultante da associação dos herbicidas.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (106 p.) Setembro, 2002.

# ANALYSIS OF METRIBUZIN AND CLOMAZONE ASSOCIATION AS A MODEL TO STUDY SYNERGISM BETWEEN HERBICIDES<sup>2</sup>

Author: Nelson Diehl Kruse  
Adviser: Ribas Antonio Vidal

## GENERAL ABSTRACT

It was hipotetized that there is synergism in the association of photosystem II and the carotenoid synthesis, because of their specific mechanisms of action. With the objective to demonstrate the existence of synergism in the association of herbicides to these two groups, experiments were conducted in laboratory, greenhouse and the field. In the laboratory, it was evaluated the interaction of metribuzin and clomazone through the estimate of oxidative stress generated by the association, in plants of sunflower, with the determination of the levels of malondialdehyde and electrolytic leakage. In the greenhouse, sunflower plants were treated with the same herbicides and had been taken samples for electronmicrographs that had produced visualization of the chloroplasts. Also treatments had been applied in order to allow the formation of dose-response curves of the same herbicides, with the representation of the doses for 50% of effect in isobolograms. It was evaluated the impact of metribuzin and clomazone association over interference relationship between soybean and sunflower with diallel design. At the field, metribuzin and clomazone were applied alone or in association for *Bidens pilosa* control on soybean crop. To evaluate the selectivity of the associations, one experiment was conducted with soybean, testing association of metribuzin and clomazone and with corn, testing association of atrazine and isoxaflutole. In the experiments with malondialdehyde, electrolytic leakage and electronmicrographs, synergism was demonstrated using Limpel method. In the assay with dose-response curves, the dry weight presented probability of synergism for the combination of clomazone and metribuzin 140 nM. At diallel experiment, the products association reduced the soybean tolerance to metribuzin and to its association with clomazone. For *B. pilosa* control, the variable weed cover and control had demonstrated synergism with the Limpel method. For selectivity evaluation, no resultant injury on the herbicides association was evidenced.

---

<sup>2</sup> Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (106 p.) September, 2002.

## SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. CAPÍTULO I - Estimativa do estresse oxidativo por MDA e extravasamento eletrolítico em girassol ( <i>Helianthus annuus</i> ), em resposta à associação dos herbicidas metribuzin e clomazone.....	12
2.1. - Resumo.....	12
2.2. - Introdução.....	13
2.3. - Material e Métodos.....	15
2.3.1. - Experimento com TBA.....	16
2.3.2. - Experimentos de condutividade eletrolítica.....	20
2.3.2.1. - Definição de I <sub>50</sub> .....	21
2.3.2.2. - Experimento com condutividade eletrolítica para associação dos herbicidas.....	23
2.4. - Resultados e Discussão.....	24
2.4.1. - Análise dos níveis de MDA.....	24
2.4.2. - Análise do extravasamento eletrolítico.....	30
2.5. - Conclusões.....	36
3. CAPÍTULO II - Modificações ultra-estruturais em cloroplastos de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> ), em decorrência da associação dos herbicidas metribuzin e clomazone.....	38
3.1. - Resumo.....	38
3.2. - Introdução.....	39
3.3. - Material e Métodos.....	41
3.4. - Resultados e Discussão.....	44
3.5. - Conclusões.....	54
4. CAPÍTULO III - Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides.....	55
4.1. - Resumo.....	55
4.2. - Introdução.....	56
4.3. - Material e Métodos.....	58
4.4. - Resultados e Discussão.....	61
4.5. - Conclusões.....	74



5. CAPÍTULO IV - Impacto da associação de metribuzin e clomazone sobre as relações de interação entre soja ( <i>Glycine max</i> ) e girassol ( <i>Helianthus annuus</i> ).....	75
5.1. - Resumo.....	75
5.2. - Introdução.....	76
5.3. - Material e Métodos.....	79
5.4. - Resultados e Discussão.....	80
5.5. - Conclusões.....	86
6. CAPÍTULO V - Análise da associação dos herbicidas metribuzin e clomazone pelo controle de <i>Bidens pilosa</i> na cultura da soja.....	88
6.1. - Resumo.....	88
6.2. - Introdução.....	89
6.3. - Material e Métodos.....	91
6.4. - Resultados e Discussão.....	93
6.5. - Conclusões.....	97
7. CAPÍTULO VI - Seletividade da associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides para as culturas de soja e milho.....	98
7.1. - Resumo.....	98
7.2. - Introdução.....	99
7.3. - Material e Métodos.....	101
7.4. - Resultados e Discussão.....	103
7.5. - Conclusões.....	107
8. DISCUSSÃO GERAL.....	108
8.1. - Introdução.....	108
8.2. - Sinergismos documentados na literatura.....	109
8.3. - Métodos empregados no estudo do sinergismo.....	110
8.4. - Modelo para demonstração de sinergismo.....	111
8.5. - Considerações finais.....	113
9. CONCLUSÕES GERAIS.....	115
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
11. APÊNDICES.....	124
12. VITA.....	134

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Páginas
TABELA 2.1. Equivalentes de MDA (eq. MDA) de folhas de girassol, calculados por três métodos distintos (Equações 2.1, 2.2 e 2.3), em resposta à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001/2002.....	25
TABELA 2.2. Condutividade eletrolítica de discos foliares de girassol, em resposta à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	34
TABELA 3.1. Médias de comprimento, largura e da razão comprimento.largura <sup>-1</sup> de cloroplastos de girassol, em resposta à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	46
TABELA 3.2. Médias de área do cloroplasto, área do sistema granatilacóides e da relação área do sistema granatilacóides.área do cloroplasto <sup>-1</sup> (AGT.AC <sup>-1</sup> ) de cloroplastos de girassol, em resposta à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	46
TABELA 4.1. Índice de combinação (IC <sub>omb</sub> ) das associações de metribuzin e clomazone, calculados a partir das doses I <sub>50</sub> obtidas das curvas de resposta às doses destes herbicidas. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	73
TABELA 5.1. Massa verde de soja e girassol, em resposta a diferentes arranjos de plantas e à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone, isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	81
TABELA 5.2. Massa seca de soja e girassol, em resposta a diferentes arranjos de plantas e à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone, isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	82

TABELA 6.1. Cobertura do solo com <i>Bidens pilosa</i> (BIDPI) e controle aos 55 dias após a aplicação dos herbicidas (DAA), densidade de BIDPI aos 30 e 55 DAA, massa seca e área foliar.planta <sup>-1</sup> , rendimento de soja (GLXMA), efeito estimado da associação e probabilidade de t. EEA UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 1998/99.....	95
TABELA 6.2. Massa seca e área foliar.planta <sup>-1</sup> de <i>Bidens pilosa</i> (BIDPI), rendimento de soja (GLXMA), efeito estimado da associação e probabilidade de t. EEA UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 1998/99.....	96
TABELA 7.1. Médias de rendimento de grãos de soja (GLXMA) em resposta aos tratamentos aplicados. EEA UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 1999/00.....	104
TABELA 7.2. Médias de rendimento de grãos de milho (ZEAMD) em resposta aos tratamentos aplicados. EEA UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 1999/00.....	105

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 2.1. Equivalentes de MDA (eq. MDA) de folhas de girassol após tratamento com os herbicidas metribuzin (met) (0,28 $\mu\text{M}$ ) e clomazone (clom) (80 $\mu\text{M}$ ), aplicados isolados e em associação (nas mesmas doses) e valores esperados pela fórmula de Limpel ( $E = X + Y(100-X)/100$ ). Colunas abaixo de mesma letra não diferem ao nível de 5% de significância (teste Waller-Duncan) e barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. *Inferior a met + clom (teste $t$ , $P < 0,01$ ). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	29
FIGURA 2.2. Curva de resposta às doses da condutividade eletrolítica de discos foliares de girassol, sob doses crescentes de metribuzin. A linha contínua representa a curva ajustada pelo modelo log-logístico e os pontos representam os valores originais de cada repetição. O $I_{50}$ definido pelo modelo está representado pela linha vertical tracejada. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	32
FIGURA 2.3. Curva de resposta às doses da condutividade eletrolítica de discos de folhas de girassol, sob doses crescentes de clomazone. A linha contínua representa a curva ajustada pelo modelo log-logístico e os pontos representam os valores originais de cada repetição. O $I_{50}$ definido pelo modelo está representado na linha vertical tracejada. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	33
FIGURA 2.4. Índice de extravasamento eletrolítico ( $I_e$ ) de discos foliares de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> ) após tratamento com os herbicidas metribuzin (met) (12 $\mu\text{M}$ ) e clomazone (clom) (237 $\mu\text{M}$ ), aplicados isolados e em associação (nas mesmas doses) e valores esperados pela fórmula de Limpel et al. (1962) ( $E = X + Y(100-X)/100$ ). Colunas abaixo de mesma letra não diferem ao nível de 5% de significância (teste Waller-Duncan) e barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. *Inferior a met + clom (teste $t$ , $P < 0,01$ ). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	35

FIGURA 3.1. Eletromicrografias de células de folhas de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> ); A: C = cloroplasto; M = mitocôndrias; E = envelope; S = estroma; B: G = pilha de grana; T = tilacóide; GA = grânulos de amido; PG = plastoglôbulos. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	45
FIGURA 3.2. Eletromicrografias de folhas de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> ) após tratamento com os herbicidas (A) metribuzin (25 g.ha <sup>-1</sup> ) e (B) clomazone (275 g.ha <sup>-1</sup> ); A: C = cloroplasto; B: G = grana. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	47
FIGURA 3.3. Eletromicrografias de folhas de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> ) após tratamento com a associação dos herbicidas metribuzin (25 g.ha <sup>-1</sup> ) e clomazone (275 g.ha <sup>-1</sup> ); A: C = cloroplasto; ER = envelope rompido; B: M = mitocôndrias. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	52
FIGURA 4.1. Curvas de resposta da massa verde de girassol às doses do herbicida metribuzin, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com clomazone. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	62
FIGURA 4.2. Curvas de resposta da massa verde de girassol às doses do herbicida clomazone, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com metribuzin. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	63
FIGURA 4.3. Curvas de resposta da massa seca de girassol às doses do herbicida metribuzin, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com clomazone. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	65
FIGURA 4.4. Curvas de resposta da massa seca de girassol às doses do herbicida clomazone, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com metribuzin. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	66
FIGURA 4.5. Curvas de resposta do dano em girassol em resposta às doses do herbicida metribuzin, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com clomazone. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	67
FIGURA 4.6. Curvas de resposta da dano em girassol em resposta às doses do herbicida clomazone, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com metribuzin. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	68

FIGURA 4.7. Isoblograma da massa verde de girassol com os valores de $I_{50}$ obtidos de curvas de resposta às doses de metribuzin (met) e clomazone (clom), aplicados isolados e em associação, com as faixas de confiança (FC) e intervalos de confiança (IC) correspondentes. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	69
FIGURA 4.8. Isoblograma da massa seca de girassol com os valores de $I_{50}$ obtidos de curvas de resposta às doses de metribuzin (met) e clomazone (clom), aplicados isolados e em associação, com as faixas de confiança (FC) e intervalos de confiança (IC) correspondentes. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	70
FIGURA 4.9. Isoblograma do dano em girassol com os valores de $I_{50}$ obtidos de curvas de resposta às doses de metribuzin (met) e clomazone (clom), aplicados isolados e em associação, com as faixas de confiança (FC) e intervalos de confiança (IC) correspondentes. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.....	72
FIGURA 8.1. Relação entre os mecanismos de ação dos herbicidas e os casos constatados de sinergismo e antagonismo. S: sinergismo; A: antagonismo; -: associação não pertinente; *: associação formulada a venda no Brasil; fundo cinza: mecanismo da interação conhecido; demais abreviaturas no Apêndice 11.2. (Adaptado de Hatzios & Penner, 1985 e Zhang et al., 1995).....	111

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A associação de dois ou mais herbicidas é uma técnica amplamente empregada no controle às plantas daninhas e compõe, ao lado de outras técnicas, modernas estratégias de manejo da vegetação. Entre as vantagens apresentadas pela associação de herbicidas estão o aumento do espectro de controle, redução de custos, menor resíduo no ambiente pelo uso de doses menores e prevenção do surgimento de plantas daninhas resistentes aos herbicidas (Hatzios & Penner, 1985; Gressel, 1990).

Por associação ou mistura de herbicidas, entende-se a utilização simultânea ou seqüencial de dois ou mais herbicidas aplicados sobre mesma área ou cultura. Esta associação produz uma interação dos herbicidas, que pode ser classificada como aditiva, sinérgica ou antagônica. É considerada aditiva quando o efeito da associação equipara-se à soma dos efeitos dos produtos aplicados isoladamente. Sinérgica, quando o efeito da mistura é superior (em controle) à soma dos efeitos dos produtos aplicados isoladamente. E antagônica, quando a interação representa um efeito inferior à soma dos efeitos dos produtos aplicados isoladamente (Hatzios & Penner, 1985; Gressel, 1990; Green & Streibig, 1993).

Muitas associações empregadas a campo, entretanto, apresentam apenas efeito aditivo, onde somente amplia-se o espectro de plantas daninhas controladas. Estas associações não exploram todas vantagens possíveis, o que

as torna menos interessantes que as associações que apresentam sinergismo, por exemplo, em que todas vantagens das associações são obtidas.

Desta forma, do ponto de vista do controle de plantas daninhas, é altamente desejável o efeito de interação sinérgica, já que pode permitir, muitas vezes, o uso de doses inferiores à dose de cada um dos produtos aplicados isoladamente. Esse sinergismo muitas vezes ocorre quando se associam dois herbicidas que apresentam diferentes mecanismos de ação, onde pode haver uma ação de complementaridade entre os mesmos, com um facilitando a ação física/bioquímica do outro (Morse, 1978; Nash, 1981; Hatzios & Penner, 1985; Green, 1989; Gressel, 1990; Matthews, 1994).

Tanto em um quanto em outro caso, isto é, na interação dos efeitos dos componentes da associação, o fenômeno envolvido é de grande complexidade, e pode incluir desde incompatibilidade físico-química entre os herbicidas, no caso de antagonismo, passando por alterações na absorção, translocação ou biotransformação de uma molécula herbicida em outra, como até aumento da atividade herbicida pela presença conjunta dos ingredientes ativos no interior da planta daninha alvo, no caso de sinergismo (Hatzios & Penner, 1985; Zhang et al. 1995). Deve-se ainda considerar que, para uma dada combinação de herbicidas, o sinergismo ou antagonismo pode ocorrer dependendo do genótipo das plantas-alvo e das doses empregadas de cada herbicida (Akobundu et al., 1975a; Zhang et al. 1995).

Fica evidente que o efeito de antagonismo é uma desvantagem e deve ser bem estudado a fim de ser evitado. Contudo, o antagonismo pode ser útil quando se trata de aumentar a seletividade, como o uso de protetores, que reduzem o dano dos herbicidas à cultura.



Já o efeito de sinergismo, é bastante desejável, pois deve aumentar a eficiência de controle, permitindo o uso de doses menores de cada um dos componentes da associação (Hatzios & Penner, 1985).

Inúmeros trabalhos têm sido realizados visando avaliar o efeito de associações de herbicidas sobre o controle de plantas daninhas e seletividade às culturas. Muitos desses trabalhos encontram-se relacionados em revisão de Hatzios & Penner (1985). Inúmeros outros trabalhos tem sido conduzidos desde então. Baseado nos resultados desses trabalhos anteriores, é plausível perguntar-se sobre que condições as interações sinérgicas ou antagônicas serão prováveis de ocorrer. Zhang et al. (1995), verificando a ocorrência de sinergismo/antagonismo em 479 exemplos de interações, observaram que é similar a chance de ocorrer sinergismo ou antagonismo para associação de herbicidas de mesmo ou diferente modo de ação. Entretanto, na concepção teórica de uma associação com ação sinérgica, parece haver potencialmente mais chance de sucesso associando-se herbicidas com diferentes mecanismos de ação, onde estes tenham alguma conexão fisiológica entre seus modos de ação, no sentido de um ter ação cooperativa sobre a ação do outro. Gressel (1990) apresenta uma associação com forte ação sinérgica, com a associação de glyphosate e imidazolinonas, onde ambos inibem a síntese de aminoácidos, porém bloqueiam a ação de enzimas de rotas diferentes, inibindo a síntese de aminoácidos diferentes.

Como inibidores do FS II figuram os herbicidas pertencentes aos grupos químicos das Triazinas, Uréias e Uracilas, utilizados no controle em pré-emergência de plantas daninhas dicotiledôneas anuais em diversas culturas.

Podem também ser aplicados em pós-emergência das plantas daninhas, durante seu estágio plantular, controlando inclusive algumas gramíneas anuais.

Seu mecanismo de ação é bem estudado e compreende a inibição do transporte do fluxo de elétrons no FS II, do que resulta sua ação fitotóxica como um todo. O transporte fotossintético de elétrons ocorre nas membranas do tilacóide dos cloroplastos. Nessas membranas estão localizados quatro complexos de proteínas de membrana: o complexo FS II, o complexo citocromo  $b_6/f$ , o complexo fotossistema I (FS I) e o complexo ATP sintase. Os complexos FS II e FS I encontram-se em regiões diferentes da membrana, com o FS II mais na região da lamela do grana (tilacóides comprimidos) e o FS I na região da lamela do estroma. Imagina-se que essa separação exista para otimizar as relativas quantidades de energia luminosa transferidas para cada centro de reação (P680 e P700) (Towers & Arnason, 1988; Fuerst & Norman, 1991; Hess, 2000).

O centro de reação do complexo FS II é formado por duas proteínas de membrana,  $D_1$  e  $D_2$ , às quais estão ligados componentes redox envolvidos na transferência de elétrons, como o centro de reação clorofila P680, o composto feoftina (receptor primário de elétrons) e as plastoquinonas  $Q_A$  e  $Q_B$  (receptores secundários de elétrons).  $Q_A$  está fortemente ligada à proteína  $D_2$ , enquanto que  $Q_B$  é uma plastoquinona trocável (móvel) que se liga a um nicho ou bolso na proteína  $D_1$  (Fuerst & Norman, 1991; Gronwald, 1994; Hess, 2000).

O complexo FS II catalisa a oxidação da água dependente de luz com a redução da plastoquinona (PQ). A energia luminosa captada é transferida ao P680, causando a separação de cargas, com a transferência do elétron excitado para a feoftina. Um elétron derivado da fotólise da água neutraliza a carga

residual positiva do  $P_{680}$ . Da feofitina o elétron é transferido para  $Q_A$ , e então para  $Q_B$ . Quando  $Q_B$  recebe um segundo elétron de  $Q_A$ , ela se torna completamente reduzida e deixa o nicho ou bolso da proteína  $D_1$  como uma plastohidroquinona ( $PQH_2$ ). Outra molécula de PQ então liga-se à proteína  $D_1$ , que quando ligada, passa a chamar-se  $Q_B$ . A  $PQH_2$  difunde-se através da membrana do tilacóide e doa dois elétrons para o complexo citocromo  $b_6f$  que os transfere para o FSI através da proteína solúvel plastocianina (Fuerst & Norman, 1991; Gronwald, 1994; Hess, 2000).

Os herbicidas inibidores do FS II ligam-se ao bolso da proteína  $D_1$  onde a PQ deveria ligar-se para poder receber os elétrons de  $Q_A$ . Desta maneira, estes herbicidas bloqueiam o transporte de elétrons por atuar como análogos não-reduzíveis da PQ, evitando assim a redução do  $NADP^+$  necessário para a fixação do  $CO_2$ . Mas a ação fitotóxica destes herbicidas não é atribuída à interrupção do fluxo de elétrons na fotossíntese, mas ao estresse oxidativo provocado pelo bloqueio do transporte de elétrons. Esse estresse destrói o centro de reação do FSII e promove a peroxidação de lipídios e de moléculas de clorofila e, conseqüentemente, das membranas fotossintetizantes. As moléculas de clorofila, que continuam a excitar-se com a luz solar, tornam-se mais carregadas energeticamente, por não transferirem os elétrons acumulados, passando a ser chamadas então de clorofila tripleto ("triplet" -  $^3Chl$ ). Nesse estado elas dão origem a uma reação em cadeia, pois formam radicais livres ( $R^*$ ), como oxigênio singleto ("singlet" -  $^1O_2$ ), superóxidos ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^*$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que irão peroxidar os lipídios das membranas, formando novos radicais lipídios, também capazes de oxidar lipídios e membranas, levando assim

as plantas tratadas à morte (Fuerst & Norman, 1991; Gronwald, 1994; Vidal, 1997; Hess, 2000).

As plantas possuem mecanismos para evitar o estresse oxidativo produzido normalmente em pequeno grau durante a fotossíntese. Mas quando as plantas são tratadas com inibidores do FS II, a quantidade de radicais produzida ultrapassa a capacidade de destoxificação desses mecanismos. Entre eles estão a ação dos carotenóides, presentes nas membranas dos tilacóides, que protegem contra  $^1O_2$ ,  $^3Chl$  e peroxidação lipídica, dissipando o excesso de energia da clorofila na forma de calor, e a ação do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), que protege contra a peroxidação lipídica e do  $OH^*$ , ambos presentes nas membranas do tilacóide (Hall & Rao, 1980; Fuerst & Norman, 1991; Sandmann et al., 1991; Gronwald, 1994;).

Outro grupo de herbicidas que também atua no processo da fotossíntese, é o grupo dos herbicidas inibidores da síntese de carotenóides, representados pelos ingredientes ativos clomazone, e isoxaflutole. Esses herbicidas são utilizados também no controle, em pré-emergência, de plantas daninhas mono e dicotiledôneas anuais e algumas perenes. Eles inibem enzimas que atuam na rota de síntese dos carotenóides, os pigmentos protetores da clorofila, tornando as folhas brancas e levando assim, as plantas sensíveis à morte (Vidal, 1997).

Quanto ao exato mecanismo de ação desses herbicidas, isto é, as enzimas ou passos da rota metabólica de síntese dos carotenóides que são interrompidos, pode-se dividi-los em dois grupos: o grupo do clomazone, cujo mecanismo de ação ainda não está esclarecido, mas com provável ação inibitória de enzima(s) que atua(m) entre o mevalonato e o geranyl-geranyl pirofosfato, integrantes da rota de síntese dos isoprenóides (Scott & Weston, 1992; Scott et

al., 1994), e o dos inibidores da enzima *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), ao qual pertence o isoxaflutole (Lee et al., 1997; Hess, 2000).

O primeiro passo na biossíntese dos carotenóides é a condensação de duas moléculas de geranyl-geranyl pirofosfato, formando pré-fitoeno pirofosfato que desfosforilado forma fitoeno. O passo seguinte, até chegar a  $\beta$ -caroteno, envolve quatro desaturações e duas ciclizações, onde as duas primeiras, até formar zeta-caroteno e tendo fitoflueno como intermediário, é que são catalisadas por fitoeno dessaturase (PDS), que é uma enzima ligada à membrana do tilacóide e pode ser solubilizada por detergentes, mas perde a atividade rapidamente. Estudos com inibidores indicam que a posterior dessaturação de zeta-caroteno até neurosporeno e então licopeno, e a seguinte ciclização até  $\beta$ -caroteno são intermediadas por outras enzimas. A ação de inibidores, como o clomazone, interrompe a síntese de carotenos e xantofilas, que não mais irão atuar na redução do estresse oxidativo (Lee et al., 1997; Hess, 2000).

Já os inibidores de HPPD atuam em outra rota de biossíntese mas com conseqüências sobre a PDS. Incluem, além do isoxaflutole (grupo dos isoxazoles), herbicidas do grupo das triquetonas (NTBC, sulcotrione). A enzima HPPD atua na rota de síntese da plastoquinona e do  $\alpha$ -tocoferol, catalizando a reação de *p*-hidroxifenilpiruvato para homogentisate que forma plastoquinona e  $\alpha$ -tocoferol. O elo de ligação com a síntese dos carotenóides está no fato que a plastoquinona é um cofator para a PDS, fazendo com que a falta deste cofator interrompa também a síntese de carotenóides (Lee et al., 1997; Hess, 2000).

A hipótese sobre a existência de sinergismo entre os inibidores do FSII e inibidores de carotenóides, que pretende-se comprovar, baseia-se na união dos dois mecanismos de ação descritos anteriormente. As plantas tratadas com

inibidores do FS II podem ter sua ação minimizada pela proteção exercida pelos carotenóides. Caso essas plantas fossem tratadas, simultânea ou seqüencialmente, por herbicidas inibidores da síntese de carotenóides, a ação do estresse oxidativo já não seria mais reduzida pelos pigmentos protetores, aumentando a ação fitotóxica. Além disso, agregar-se-ia a própria ação fitotóxica dos inibidores da síntese de carotenóides, resultando, em seu conjunto, numa ação muito mais intensa e letal.

Considerando-se o último grupo de herbicidas descrito, o dos inibidores de HPPD, existem ainda duas razões adicionais para supor-se a existência de sinergismo. Como estes herbicidas inibem a síntese de plastoquinona, a inibição no transporte de elétrons será ainda maior, pela falta de plastoquinona para ligar-se ao bolso da proteína  $D_1$  e receber os elétrons de  $Q_A$ . Uma segunda razão seria a de que o  $\alpha$ -tocoferol atua como protetor da peroxidação lipídica e de  $OH^*$ , o qual tendo sua síntese interrompida, perderia sua ação de proteção.

A comprovação do efeito sinérgico apresentado por uma associação de produtos nem sempre é tarefa fácil e pode ser tema de controvérsia, como por exemplo, quando se reivindica a patente de uma associação. Por isso, há necessidade de desenvolver-se uma metodologia adequada para comprovar a existência deste tipo de ação, que irá subsidiar os experimentos a serem conduzidos a fim de testar-se a presença de interação sinérgica. Muitas metodologias para comprovação do efeito estão apresentadas na literatura e cada uma delas pode ser adequada a uma determinada combinação de tratamentos.

O conhecido método de Colby, um dos mais empregados para a comprovação de sinergismo entre associações, utiliza fórmula matemática

modificada, introduzida inicialmente por Gowing (1959), e depois por Limpel et al. (1962) (Capítulo I, Equação 2.5).

O método da Equação 2.5 utiliza um modelo multiplicativo, ao invés de aditivo, isto é sendo válido somente para casos onde os componentes da associação exibem ação não similar, (Colby, 1967; Hatzios & Penner, 1985).

Entre os trabalhos mais atuais, o método que tem evoluído é aquele que emprega modelos de regressão não linear para ajuste dos resultados obtidos. As curvas de resposta mais comum incluem curvas polinomiais e logarítmicas ou exponenciais, sendo possível também curvas hipérbole-retangular ou polinomiais inversas, ou mais adequadamente, curvas logísticas (Akobundu et al., 1975b; Morse, 1978; Hatzios & Penner, 1985; Seefeldt et al., 1995).

Em complemento aos resultados obtidos pelas curvas de resposta às doses do modelo logístico, tem-se aplicado a técnica de representação dos isobogramas. Constrói-se uma representação gráfica do comportamento da associação em relação à união dos componentes isolados, a partir de uma isobole de aditividade, gerada pela união das doses de igual resposta dos componentes isolados. As linhas ou contornos de igual resposta (50% de dano ou  $I_{50}$ ) é que são chamadas de isoboles. Tem sido apontado com desvantagem desse método o grande número de plantas-teste exigidas para obter um gráfico com a transformação “probit” (unidade de probabilidade) para as necessárias interpolações. Uma forma proposta de superar esse obstáculo é a de não usar a transformação “probit”, empregando a linearidade da curva-resposta de dose ao nível de 50%. Outro obstáculo ao emprego deste método é a dificuldade para testar-se estatisticamente as respostas esperada do modelo de referência,

embora o uso de intervalos de confiança tem possibilitado análises conclusivas sobre as interações (Morse, 1978; Green & Streibig, 1993; Gessner, 1995).

De qualquer forma, o que se estará avaliando, em última análise, será a resposta de organismos vivos ao tratamento com agentes químicos exógenos. As plantas como organismos complexos que são, sofrerão a ação conjunta dos herbicidas associados, no interior da célula ou, mais especificamente, nas membranas que formam o cloroplasto. Desta forma, é que propõe-se a presente hipótese, que supõe a existência de ação sinérgica na associação de herbicidas inibidores do fluxo de elétrons do fotossistema II (FS II) com inibidores da síntese de carotenóides. Daí que a comprovação da hipótese de sinergismo deve inicialmente demonstrar a ação cooperativa dos herbicidas ao nível bioquímico, onde de fato os processos irão ocorrer. Como consequência direta da ação ao nível bioquímico, deverá ser demonstrada a alteração no nível seguinte, o ultra-estrutural. A comprovação da interação ao nível das organelas e células deverá ser acompanhada pelo efeito ao nível do indivíduo, isto é, da planta toda. Como as plantas, tanto as cultivadas como as plantas daninhas interagem ao nível de comunidade, a comprovação da hipótese deverá estender-se ao nível de controle de plantas daninhas e seletividade da associação às culturas.

Para tanto, é que estabeleceu-se como objetivo geral deste trabalho a demonstração da existência de sinergismo na associação de herbicidas inibidores do fluxo de elétrons do fotossistema II e da síntese de carotenóides. Como modelo de estudo para atingir este objetivo geral, empregar-se-á a associação dos herbicidas metribuzin e clomazone, representando respectivamente os dois mecanismos de ação. Como objetivos específicos, que serão tratados individualmente em cada capítulo deste trabalho figuram: a demonstração da



existência de sinergismo ao nível bioquímico, a ser tratado no Capítulo I; a demonstração da existência de sinergismo ao nível celular, a ser tratado no Capítulo II; a demonstração da existência de sinergismo ao nível de indivíduo, a ser tratado no Capítulo III; a demonstração da existência de sinergismo ao nível de comunidade, com ênfase nas relações de interferência entre soja e girassol, neste caso como simuladora da planta daninha, a ser tratado no Capítulo IV; a demonstração da existência de sinergismo ao nível de comunidade, com ênfase na planta daninha, a ser tratado no Capítulo V; a demonstração da existência de sinergismo ao nível de comunidade, com ênfase na cultura, a ser tratado no Capítulo VI.

## **2. CAPÍTULO I - ESTIMATIVA DO ESTRESSE OXIDATIVO POR MALONDIALDEÍDO E EXTRAVASAMENTO ELETROLÍTICO EM GIRASSOL (*Helianthus annuus*), EM RESPOSTA À ASSOCIAÇÃO DOS HERBICIDAS METRIBUZIN E CLOMAZONE**

### **2.1. RESUMO**

Estimar o efeito da associação de herbicidas por meios bioquímico e físico-químico pode fornecer evidências comprovadoras do tipo de interação existente. Baseado neste fundamento, conduziu-se dois experimentos com a aplicação de herbicidas causadores de estresse oxidativo com a intenção de comprovar possível sinergismo na sua associação. Aplicou-se metribuzin a 0 e 0,28  $\mu\text{Molar}$  (M) e clomazone a 0 e 80  $\mu\text{M}$ , em quatro repetições, isolados e em associação, na solução nutritiva com plantas de girassol (dois pares de folhas). No material coletado 3 dias após, determinou-se o malondialdeído (MDA) pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA). Em outro experimento, aplicou-se metribuzin a 0 e 12  $\mu\text{M}$  e clomazone a 0 e 237  $\mu\text{M}$ , em quatro repetições, isolados e em associação, sobre 40 discos de folhas de girassol (4 mm  $\varnothing$ ) em 5 ml de tampão MES-NaOH pH 6,5. Incubou-se a 24°C no escuro por 24 h e 36 h na luz. Mediu-se então a condutividade eletrolítica da solução. A associação dos dois herbicidas elevou o nível de equivalente MDA (eq. MDA) em 217 e 166%, em relação ao metribuzin e clomazone isolados, respectivamente. A associação dos produtos elevou os valores de condutividade eletrolítica em 37 e 41%, em relação

aos produtos mencionados. Os resultados comprovam, ao nível bioquímico e físico-químico, a existência de sinergismo na associação destes herbicidas, nas doses estudadas.

## 2.2. INTRODUÇÃO

A associação de herbicidas inibidores do fluxo de elétrons no fotossistema II (FS II) com herbicidas inibidores da síntese de carotenóides gera elevado estresse oxidativo, que culmina com a morte das plantas sensíveis. O estudo da interação existente nesta associação, se aditiva, sinérgica ou antagônica, é tarefa complexa e demanda abordagens em diferentes níveis. A intensidade dos efeitos do estresse oxidativo pode ser determinada ao nível da planta inteira, ou ao nível dos tecidos tratados e, mais especificamente, ao nível celular. Para tanto, é necessário avaliar variáveis que estejam diretamente relacionadas ao grau de estresse provocado. Assim, a estimativa do estresse oxidativo por estes indicadores, ao nível celular, pode, ao lado de outras abordagens, fornecer elementos comprovadores do tipo de interação existente nesta associação (Devine et al., 1993d; Streibig & Kudsk, 1993).

Os herbicidas inibidores do FS II, entre eles o metribuzin (Apêndice 11.1.2), exercem sua ação herbicida inicialmente pelo bloqueio do fluxo de elétrons do FS II. Este bloqueio ocorre porque estes herbicidas ligam-se à proteína  $D_1$ , no “bolso” onde deveria ligar-se a plastoquinona  $Q_B$ , que recebendo elétrons de  $Q_A$ , dá prosseguimento ao transporte de elétrons. Com o herbicida ligado ao “bolso” da proteína  $D_1$ , o transporte de elétrons fica bloqueado. Este bloqueio impede a transferência de energia da clorofila para o centro de reação  $P_{680}$ , o que dá origem a uma clorofila altamente reativa, a clorofila tripleto ( $^3Chl$ ). Esta clorofila

reage com o oxigênio molecular, gerando formas reativas de oxigênio. Todas estas moléculas altamente reativas, os radicais livres, irão reagir com os lipídios formadores das membranas, originando a peroxidação lipídica, que além de formar novos radicais lipídicos, danificam irreversivelmente as membranas celulares (Hess, 2000; Fleck & Vidal, 2001).

O estresse oxidativo gerado por este tipo de ação herbicida é normalmente amenizado por ação das defesas naturais da planta ao estresse, destacando-se o papel dos carotenóides. Os carotenóides são capazes de reagir com os radicais livres, dissipando sua energia na forma de calor. Em condições normais, a ação dos carotenóides é suficiente para impedir o dano às membranas. Mas, quando a planta recebe um herbicida como o metribuzin, a capacidade protetora dos carotenóides é ultrapassada e a planta sofre a peroxidação lipídica (Devine et al., 1993a; Devine et al., 1993b; Buchanan et al. 2000a; Hess, 2000; Fleck & Vidal, 2001).

Herbicidas como o clomazone (Apêndice 11.1.2) tem seu mecanismo de ação centrado na inibição da rota de síntese dos carotenóides. Com a presença reduzida ou ausência de carotenóides, a planta fica sujeita à ação dos radicais livres normalmente formados, sofrendo os danos nas membranas da mesma forma descrita anteriormente. Por isso, hipotetiza-se que a associação de herbicidas inibidores do FS II, como o metribuzin, com herbicidas inibidores da síntese de carotenóides, como o clomazone, poderá apresentar ação sinérgica, pelo aumento do estresse oxidativo, de um lado, e pela redução das defesas naturais, de outro (Devine et al., 1993a; Devine et al., 1993b; Devine et al., 1993c; Fleck & Vidal, 2001; Kruse, 2001).

Tanto na utilização isolada do metribuzin como do clomazone, e em sua associação, ocorrerá o estresse oxidativo, desencadeando, então, a peroxidação de lipídios. Um dos metabólitos resultantes da peroxidação lipídica, é o malondialdeído (MDA). Portanto, a sua determinação, ainda que de forma indireta, constitui-se em um indicador de avaliação do grau do estresse oxidativo formado pela ação isolada, ou mesmo conjunta, dos herbicidas considerados (Kenyon et al., 1985; Halliwell & Gutteridge, 1989).

A conseqüência direta do dano às membranas celulares pela peroxidação lipídica é o extravasamento do conteúdo celular para o meio que estiver envolvendo os tecidos danificados, quando o dano for suficiente para tanto. Assim, a determinação do extravasamento eletrolítico em solução de incubação de tecidos vegetais tratados com os herbicidas, através da condutividade eletrolítica da solução, constitui-se em mais uma variável para avaliação do efeito dos herbicidas ao nível celular (Kenyon et al., 1985; Dayan et al., 1997; Li et al., 2000).

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de obter evidências sobre o tipo de interação existente na associação de herbicidas inibidores do FS II, como o metribuzin, com inibidores da síntese de carotenóides, como o clomazone, pela estimativa do estresse oxidativo, através dos níveis de MDA e do extravasamento eletrolítico.

### **2.3. MATERIAL E MÉTODOS**

Vários experimentos independentes foram conduzidos para atingir os objetivos propostos.

### 2.3.1. Experimento com TBA

Os tratamentos testados neste experimento foram representados por aplicação dos herbicidas na solução nutritiva onde cultivou-se plântulas de girassol do híbrido DKB 11. Foram testados metribuzin, nas doses de 0 e 0,28  $\mu\text{Molar}$  ( $\mu\text{M}$ ) e clomazone, nas doses de 0 e 80  $\mu\text{M}$ , aplicados isoladamente e em associação. As doses foram escolhidas atendendo ao critério de utilizar-se doses próximas à dose que provoca 50% do efeito total possível, denominada de  $I_{50}$ . Normalmente esta dose encontra-se em região de resposta linear ao efeito do herbicida, por isso, presta-se melhor para a comprovação de sinergismo (Tammes, 1964; Hamill & Penner, 1973; Nash, 1981; Hatzios & Penner, 1985; Seefeldt, et al., 1995). Foram empregadas as doses  $I_{50}$  definidas a partir das curvas de resposta às doses obtidas no experimento descrito no Capítulo III, válidas para os herbicidas citados acima, aplicados na solução nutritiva de cultivo de girassol, em condições semelhantes às deste experimento.

Sementes de girassol foram colocadas para germinação em meados de janeiro. Uma semana após, transplantou-se três plântulas por vaso, estes com dimensões de 10 cm de diâmetro, 17 cm de altura e 1200  $\text{cm}^3$  de capacidade volumétrica. Os vasos de polietileno tereftalato (PET) foram mantidos revestidos com papel alumínio. As plântulas foram fixadas em placa de isopor encaixada no vaso. A solução nutritiva utilizada foi constituída de acordo com o proposto por Hoagland & Arnon, descrito em Hewitt (1966), com as seguintes concentrações:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  4 mMolar (M),  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2 mM,  $\text{KNO}_3$  4 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,435 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 mM,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,3  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,8  $\mu\text{M}$ ,

NaCl 30  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  10  $\mu\text{M}$  e FeEDTA 10  $\mu\text{M}$ . Foram empregados 1000 ml da solução por vaso, mantida com pH de 6,5 e sob aeração constante. A cada três dias era completado o volume e verificado o pH, sendo corrigido quando necessário com NaOH 1 N. O delineamento experimental foi completamente casualizado, com quatro repetições.

Os tratamentos herbicidas foram aplicados quando as plantas apresentavam o segundo par de folhas completamente expandidas. Preparou-se solução herbicida para cada dose testada, de forma que 1 ml desta solução, diluída no volume do vaso, resultasse na dose desejada. Para a aplicação, retirava-se a placa de isopor com as plantas, adicionava-se a solução herbicida, agitando-se vigorosamente com auxílio de bastão de vidro. Nos três dias subsequentes à aplicação, as plantas permaneceram em ambiente protegido (estufa plástica), com temperatura máxima média de  $36^\circ\text{C}$ , mínima média de  $20^\circ\text{C}$ . A radiação teve duração de 11 h 18 min, 11 h 30 min e 12 h (heliógrafo Fuess), respectivamente, para cada dia após a aplicação (DAA), com fluxo fotônico fotossintético máximo equivalente a  $950 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (sensor quântico acoplado a porômetro Li-Cor 1600).

Quando do estabelecimento dos sintomas visuais nas folhas, ao final do terceiro dia, coletou-se o material para análise de MDA. Foram tomadas folhas do segundo par de cada planta presente nos vasos. Imediatamente posterior ao secionamento da folha, foram retiradas as nervuras centrais, obtendo-se 0,5 g de tecido verde para a análise. Logo após pesadas, as folhas foram colocadas em tubo "ependorph" de 1,5 ml e mergulhadas em nitrogênio líquido, para imediato congelamento e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  até o uso (Velikova et al., 2000).

Para a estimativa do estresse oxidativo através da peroxidação lipídica, com a medição indireta de seu produto, o MDA, pelo método TBA (ou TBARS) (Halliwell & Gutteridge, 1989), seguiu-se o proposto por Heath & Packer, 1968, com algumas modificações (Du & Bramlage, 1992; Hodges et al., 1999; Velikova et al., 2000; Fu & Huang, 2001). O tecido vegetal congelado, imerso em nitrogênio líquido, foi triturado em almofariz e homogeneizado em 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (massa.volume<sup>-1</sup>). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 20 min, em centrífuga refrigerada a 4°C (Sigma 3K30) e 0,5 ml do sobrenadante foi adicionado a 1 ml de TCA 20% + TBA 0,5% (peso.volume<sup>-1</sup>). Após agitada, a mistura foi incubada em água a 90°C por 30 min e paralisada a reação ao final, por imersão dos tubos em banho de gelo. Foi feita então nova centrifugação a 10.000 g por 5 min. Outros 0,5 ml do sobrenadante foram adicionados a 1 ml de TCA 20%, sendo agitados, incubados, imersos em banho de gelo e centrifugados como já descrito. Durante este processo, as amostras estiveram sempre refrigeradas em banho de gelo. Foi então lida a absorbância (Spectronic® Genesis™ II) a 532 e a 600 nm, onde 532 nm representa a máxima absorção do complexo MDA-TBA e 600 nm a absorção de turbidez não específica (Heath & Packer, 1968; Du & Bramlage, 1992; Hodges et al., 1999; Velikova et al., 2000; Fu & Huang, 2001).

A quantidade do complexo MDA-TBA (equivalente MDA = eq. MDA) foi calculada de três formas (a seguir). A primeira forma de calcular eq. MDA (nmol.g.MV<sup>-1</sup>) (Kwon et al., 1965; Halliwell & Gutteridge, 1989) utilizou apenas a absorbância a 532 nm ( $A_{532+TBA}$ ), empregando-se a Equação 2.1:

$$\text{eq. MDA} = 60.000 \cdot \{A_{532+TBA} / 156\}$$

Equação 2.1.



A segunda forma de calcular eq. MDA (Heath & Packer, 1968; Du & Bramlage, 1992) utilizou absorvância de 532 e 600nm ( $A_{600+TBA}$ ), não descontando a absorvância das amostras sem TBA, empregando-se a Equação 2.2:

$$\text{eq. MDA} = 60.000 \cdot \{(A_{532+TBA} - A_{600+TBA})\} / 156 \quad \text{Equação 2.2.}$$

A terceira forma de calcular eq. MDA (Hodges et al., 1999) utilizou absorvância de 532 e 600nm e descontou-se a absorvância das amostras sem TBA, empregando-se a Equação 2.3:

$$\text{eq. MDA} = 60.000 \cdot \{[(A_{532+TBA} - A_{600+TBA}) - (A_{532-TBA} - A_{600-TBA})]\} / 156 \quad \text{Equação 2.3.}$$

Os resultados obtidos de eq. MDA pelas equações 2.1, 2.2 e 2.3 foram submetidos à análise da variância, segundo o procedimento proposto por Flint et al. (1988), que oferece tratamento estatístico à fórmula de Limpel (Limpel et al., 1962; Devine et al., 1993d), modificada por Colby (1967). O procedimento propõe a análise em esquema fatorial, com transformação dos dados para logaritmo decimal e a estimativa da interação  $I_{ij}$  como forma de verificar a existência de sinergismo. A interação  $I_{ij}$  é estimada subtraindo-se do efeito dos herbicidas em associação  $\mu_{ij}$ , os efeitos dos fatores isolados ( $\mu_{i0}$  e  $\mu_{0j}$ ) e somando-se o efeito dos níveis 0 dos dois fatores ( $\mu_{00}$ ), da seguinte forma:

$$I_{ij} = \mu_{ij} - \mu_{i0} - \mu_{0j} + \mu_{00} \quad \text{Equação 2.4.}$$

Haverá a indicação de sinergismo se  $I_{ij} > 0$ , antagonismo se  $I_{ij} < 0$  e aditividade se  $I_{ij} = 0$ , todos com significância estatística, para variáveis que

aumentem de magnitude com a ação herbicida, como as estudadas neste trabalho. É proposta uma rotina para o aplicativo computacional SAS<sup>®</sup>, que executa a análise pelo modelo linear geral (GLM), testando a significância da interação diretamente como parâmetro do modelo (coeficiente de regressão) pelo teste *t* (Flint et al., 1988) (Apêndice 11.4).

Alternativamente a esta análise, foi realizada uma segunda análise da variância, para a variável eq. MDA calculada pela Equação 2.3. Seguiu o esquema de classificação simples, com comparação entre as médias pelo teste Waller-Duncan e pelos erros-padrões das médias dos tratamentos (Riboldi, 1995a). Além dos quatro tratamentos testados (sem herbicida, metribuzin a 0,28 µM, clomazone a 80 µM e metribuzin 0,28 µM + clomazone 80 µM), foram calculados valores estimados pela fórmula de Limpel et al. (1962), expressa na Equação 2.5:

$$E = Y_1 + Y_2(100-Y_1)/100 \quad \text{Equação 2.5,}$$

onde E representa o valor esperado com a associação dos herbicidas e  $Y_1$  e  $Y_2$  representam o resultado obtido pela aplicação isolada de cada herbicida, para cada repetição. Os valores obtidos desta forma estimam o resultado esperado se a associação entre os herbicidas apresentar interação nula (aditividade). Se os resultados da associação forem superiores a estes, a interação será sinérgica e antagônica se forem inferiores (Limpel et al., 1962, Colby, 1967; Devine et al., 1993d). Os valores esperados assim calculados foram comparados com os resultados do tratamento com a associação de metribuzin + clomazone por comparação de dois tratamentos em amostras independentes quando  $n_1 = n_2$  (teste *t*) (Steel & Torrie, 1980; Riboldi, 1993).

### **2.3.2. Experimentos de condutividade eletrolítica**

Neste trabalho foi realizado um experimento preliminar para definir as doses a serem empregadas no experimento de associação dos herbicidas. Após definidas as doses necessárias para aumentar a condutividade eletrolítica em 50% ( $I_{50}$ ), realizou-se o experimento de associação entre herbicidas. Em ambos experimentos, os tratamentos testados foram aplicados em discos de folhas de girassol do híbrido DKB 11, coletadas quando as plantas estavam no estágio de dois a três pares de folhas verdadeiras.

#### **2.3.2.1. Definição de $I_{50}$**

Foram avaliadas curvas de resposta às doses para o metribuzin e clomazone, a fim de determinar a  $I_{50}$  para cada herbicida, nas condições do experimento em questão. A dose  $I_{50}$  é a que fornece a estimativa mais acurada possível da sensibilidade da planta ao herbicida e, também, permite a comparação com outros experimentos (Seefeldt et al., 1995). Para avaliação da resposta às doses do herbicida metribuzin foram empregadas as concentrações de 0, 5, 10, 20, 40 e 80  $\mu\text{M}$ , e para o clomazone de 0, 50, 100, 200, 400 e 800  $\mu\text{M}$  (Seefeldt, et al., 1995). As plantas de girassol que forneceram os discos foliares foram obtidas por semeadura, em meados de outubro, sobre bandejas de 25 x 40 x 10 cm, contendo como substrato solo peneirado, cuja análise físico-química indicou 290  $\text{g.kg}^{-1}$  de argila, 19  $\text{g.kg}^{-1}$  de matéria orgânica, 25  $\text{mg.dm}^{-3}$  de P, 123  $\text{mg.dm}^{-3}$  de K e pH ( $\text{H}_2\text{O:solo}$  1:1) de 6,0. As plantas foram mantidas em ambiente protegido (estufa plástica), com temperatura máxima média de 32°C, mínima média de 20°C, fotoperíodo médio de luz natural de 13 horas e fluxo fotônico fotossintético máximo de 950  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ao meio dia. As plantas foram irrigadas sempre que necessário.

Duas semanas após a emergência das plântulas, folhas do segundo e terceiro par foram seccionadas das plantas e lavadas com a solução de incubação. Das folhas extraíram-se 40 discos de 4 mm de diâmetro para cada repetição. Foram feitas três repetições para cada dose de herbicida testada. A solução de incubação continha água destilada com 1% (p.v<sup>-1</sup>) de sacarose e 1 mM do tampão (MES NaOH {2-(*N*-morfolino)ácido etanosulfônico}), pH 6,5. Os discos foram colocados em placas de petri de 6,0 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura, com 5 ml da solução de incubação. A esta solução foram adicionados 0,5 ml de solução contendo os herbicidas em diferentes concentrações, para atingir as doses estudadas (Kenyon et al., 1985; Dayan et al., 1997; Li et al., 2000).

Os discos foliares foram então incubados em câmara climatizada, por 24 h na ausência de luz e por 36 h sob fluxo fotônico fotossintético médio de 95  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , sempre a  $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Após os períodos de incubação, a solução sem os discos foi colocada em tubos e medida a condutividade eletrolítica por condutivímetro (Analion C-708) com eletrodo de platina e expressa em  $\mu\text{mho.cm}^{-1}$  (Kenyon et al., 1985; Dayan et al., 1997; Li et al., 2000).

Os resultados obtidos para cada herbicida foram ajustados pelo modelo log-logístico expresso na Equação 2.6:

$$y = C + D - C / 1 + \exp[b(\text{Ln}(x) - \text{Ln}(I_{50}))] \quad \text{Equação 2.6,}$$

onde  $y$  é a variável resposta estimada,  $C$  é o valor de  $y$  para a dose 0,  $D$  é o valor máximo de  $y$ ,  $\text{Ln}(x)$  é o logaritmo natural de cada dose,  $\text{Ln}(I_{50})$  é o logaritmo natural da dose que provoca 50% do efeito máximo e  $b$  é o parâmetro que indica a declividade da curva em torno de  $I_{50}$ . Os resultados foram submetidos à análise de variância. Com o auxílio do aplicativo computacional SigmaPlot (SPSS Inc.)

obteve-se a estimativa do parâmetro  $I_{50}$ , que forneceu as doses a serem empregadas no experimento com a associação dos herbicidas (Streibig & KudsK, 1993; Seefeldt et al., 1995).

### **2.3.2.2. Experimento com condutividade eletrolítica para associação dos herbicidas**

Para o experimento de associação dos herbicidas, plantas de girassol do mesmo híbrido foram cultivadas da forma descrita anteriormente, com semeadura em meados de novembro. Neste experimento, as condições da estufa plástica foram semelhantes às condições descritas em 2.3.2.1. A extração dos discos ocorreu duas semanas após a emergências das plântulas, seguindo o mesmo protocolo descrito para o experimento anterior.

Foram testados os herbicidas metribuzin, nas doses de 0 e 12  $\mu\text{M}$  e clomazone, nas doses de 0 e 230  $\mu\text{M}$ , aplicados isoladamente e em associação, com quatro repetições para cada tratamento, em delineamento completamente casualizado. Um quinto tratamento incluiu discos sem tratamento herbicida, que sofreram, após a incubação, imersão em banho de água a 95°C, para provocar o máximo extravasamento eletrolítico possível (Li et al., 2000).

Os resultados obtidos foram submetidos às mesmas análises estatísticas descritas no experimento com MDA. A primeira forma para análise estatística aplicou-se o modelo proposto por Flint et al. (1988), para os valores originais de condutividade, expressos em  $\mu\text{mho.cm}^{-1}$ , com transformação para logaritmo decimal. A condutividade também foi expressa pelo Índice de extravasamento eletrolítico relativo ( $I_e$ ), calculado utilizando-se a Equação 2.7:

$$I_e = 100(R_1 - R_0(1 - R_0))$$

Equação 2.7,

onde  $R_1$  é a razão entre a condutividade de discos tratados e a máxima condutividade possível, obtida pelo tratamento de imersão em água a 95°C;  $R_0$ , a razão entre a condutividade dos discos não tratados e a máxima possível (Li et al., 2000). A segunda forma para análise estatística, fez-se a análise da variância em esquema de classificação simples, com os quatro tratamentos originais e o quinto tratamento com o banho-maria a 95°C. As médias também foram comparadas pelo teste Waller-Duncan e pelos seus erros-padrões da média (Riboldi, 1995a). Novamente foi aplicada a Equação 2.5 sobre a variável  $I_e$  e os valores esperados foram comparados com os resultados do tratamento com a associação de metribuzin + clomazone, por comparação de dois tratamentos em amostras independentes quando  $n_1 = n_2$  (teste  $t$ ) (Steel & Torrie, 1980; Riboldi, 1993).

## 2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1. Análise dos níveis de MDA

O estresse oxidativo resultante da ação dos herbicidas metribuzin e clomazone provoca a peroxidação lipídica, danificando e destruindo as membranas celulares. O composto resultante desta peroxidação é o MDA. Portanto, a intensidade da ação herbicida pode ser medida, ao nível celular-bioquímico, pela determinação dos níveis de eq. MDA no tecido tratado (Devine et al., 1993a).

A estimativa do estresse oxidativo em folhas de girassol pela quantidade de eq. MDA pelas três formas diferentes de calcular o eq. MDA disponíveis na literatura demonstra a necessidade de adotar métodos que subtraíam a absorvância de turbidez não específica (Tabela 2.1). A Equação 2.1, que utiliza

apenas a absorvância obtida no comprimento de onda de máxima absorção do aducto TBA-MDA, 532 nm, é bastante empregada em tecidos de origem animal, para os quais o método TBA foi originalmente desenvolvido (Halliwell & Gutteridge, 1989). Nestes tecidos, provavelmente, não ocorrem substâncias que possam prejudicar a medida acurada de MDA no tecido. Já em tecidos vegetais, este método demonstra não ser adequado, pois a presença de outros compostos pode interferir na correta determinação dos níveis de MDA (Hodges et al., 1999).

TABELA 2.1. Equivalentes de MDA (eq. MDA) de folhas de girassol, calculados por três métodos distintos (Equações 2.1, 2.2 e 2.3), em resposta à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001/2002.

Tratamentos	Eq. MDA (nmol.g.MV <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>		
	Equação 2.1	Equação 2.2	Equação 2.3
Tratamento sem herbicida	17,4	11,5	11,2
Metribuzin 0,28 µM	13,9	10,5	9,9
Clomazone 80 µM	50,0	11,4	11,8
Metribuzin + clomazone	42,2	33,7	31,4
Estimativa da interação <sup>2</sup>	-4,33	23,27	20,95
Probabilidade ( $t_{\text{calc.}} > t_{\text{tab.}}$ )	0,70	<0,01	<0,01
CV (%) <sup>3</sup>	6,13	11,01	3,06

<sup>1</sup> Equação 1 =  $\{(A_{532+TBA})/156\} 60.000$ ; Equação 2 =  $\{(A_{532+TBA} - A_{600+TBA})/156\} 60.000$ ; Equação 3 =  $\{[(A_{532+TBA} - A_{600+TBA}) - (A_{532-TBA} - A_{600-TBA})]/156\} 60.000$ , onde  $A_{532+TBA}$  = absorvância a 532 nm com TBA ( $-TBA$  = sem TBA);  $A_{600}$  = absorvância a 600 nm; 156 = coeficiente de extinção molar do MDA em mM cm<sup>-1</sup>; 60.000 = fator de conversão.

<sup>2</sup>  $I_{ij} = \mu_{ij} - \mu_{i0} - \mu_{0j} + \mu_{00}$ , onde  $I_{ij}$  = estimativa da interação segundo Flint et al. (1988);  $\mu_i$  = efeito dos herbicidas em associação;  $\mu_{i0}$  e  $\mu_{0j}$  = efeito dos herbicidas aplicados isoladamente;  $\mu_{00}$  = efeito dos níveis 0 dos herbicidas.

<sup>3</sup> Desvio padrão relativo.

A Equação 2.1 superestimou os valores de eq. MDA em todos os tratamentos e, principalmente, no tratamento com clomazone, sendo até mesmo superior à associação dos herbicidas metribuzin e clomazone. Isto refletiu-se na análise da interação existente na associação, pelo método proposto por Flint et al. (1988) e sugere interação antagônica (pelo valor negativo da estimativa da interação), mas como o teste  $t$  não foi significativo, pela Equação 2.1 concluir-se-ia por ausência de interação. Quando a probabilidade da estimativa da interação

for inferior a  $\alpha$  (0,05), rejeita-se  $H_0$  (interação entre herbicidas ausente ou aditiva). Caso a estimativa da interação seja positiva, confirma-se, então, sinergismo. Caso a estimativa da interação seja negativa, confirma-se antagonismo (Flint et al., 1988).

Cabe ressaltar que a proposta inicial de Flint et al. (1988) é de que há sinergismo quando a estimativa for menor do que zero e antagonismo quando for maior do que zero. Ocorre que os autores, no exemplo que apresentam, trabalham com a variável massa do caule, que decresce de magnitude com o tratamento herbicida, da mesma forma com que Colby (1967) exemplifica sua proposta. No presente trabalho, as variáveis estudadas (peroxidação de lipídios e extravasamento do conteúdo celular) aumentam de magnitude com o tratamento herbicida. Portanto, é de se esperar sinergismo em estimativas de interação maiores do que zero. Por isso, quando for aplicada a proposta de Flint et al. (1988), é necessário considerar a natureza da variável estudada, em função do tratamento herbicida, adaptando o resultado de acordo com a variável em questão.

Os níveis de eq. MDA calculados pelas Equações 2.2 e 2.3 (Tabela 2.1) apresentam estimativas da interação maiores do que zero, com probabilidade inferior a 0,05, confirmando, portanto, para a existência de sinergismo na associação dos herbicidas e nas doses estudados.

A obtenção de resultados opostos, exclusivamente pela forma de calcular os valores de eq. MDA (Equação 2.1 *versus* Equações 2.2 e 2.3 - Tabela 2.1), demonstra a necessidade de empregar-se a leitura da absorbância também a 600 nm na análise de tecido vegetal. Esta leitura permite retirar-se dos resultados a influência de outras substâncias presentes no tecido vegetal que, reagindo com o



TBA, absorvem luz em comprimento de onda próximos aos 532 nm, mascarando os resultados. Há ainda autores que preconizam também a leitura a 440 nm, a fim de retirar a influência de sacarose no resultado final, já que ela pode estar presente em tecidos como frutos, colmos e raízes e reagem com TBA (Du & Bramlage, 1992).

As Equações 2.2 e 2.3 para o cálculo do eq. MDA produziram resultados bastante semelhantes e possuem capacidade equivalente de demonstrar o sinergismo na associação dos herbicidas, nas doses empregadas. A diferença entre ambos está na condução paralela de subamostras com e sem TBA, para permitir a eliminação de interferência de compostos que, mesmo sem reagir com TBA, possam aumentar a absorbância nos comprimentos de onda utilizados. Pelos resultados equivalentes obtidos neste trabalho, verifica-se não haver necessidade de conduzir-se subamostras sem TBA, o que não garante que em outros tecidos ou espécies, este procedimento não deva ser realizado (Hodges et al., 1999). De qualquer forma, adotar-se-ão os resultados da Equação 2.3, como os definitivos para este trabalho.

A elevada significância ( $P < 0,01$ ) obtida para a estimativa da interação entre herbicidas ser diferente de zero, evidencia ao nível bioquímico o sinergismo na associação de metribuzin e clomazone, nas doses empregadas (Tabela 2.1). Os níveis de eq. MDA encontrados nas folhas de plantas tratadas com os herbicidas associados, indicam a ocorrência de peroxidação lipídica em intensidade muito superior à encontrada nos tratamentos com os herbicidas aplicados de forma isolada. Convém ressaltar a acentuada superioridade dos níveis de eq. MDA do tratamento de metribuzin mais clomazone, não só em relação aos tratamentos com os herbicidas aplicados isoladamente, mas também

em relação à estimativa obtida pela fórmula de Limpel et al., (1962) (Equação 2.5) (Figura 2.1).

A inclusão de valores calculados pela Equação 2.5, comparados pelo teste *t* com o tratamento metribuzin + clomazone, pretendeu fornecer uma alternativa ao modelo de análise proposto por Flint et. al. (1988). Esse modelo foi justamente desenvolvido para preencher a lacuna deixada por Limpel et al. (1962) e Colby (1967), que não propuseram meio estatístico de comparação dos valores estimados com os realmente obtidos pela associação. Mas o seu desenvolvimento inclui derivações matemáticas não tão facilmente disponíveis (Apêndices 11.4 e 11.5). Por isso, buscou-se produzir, alternativamente, uma análise de maior acessibilidade, também apresentando tratamento estatístico à fórmula de Limpel et al. (1962). Efetuou-se a comparação dos valores esperados com os realmente obtidos, aplicando-se a Equação 2.5 para cada repetição dos tratamentos com metribuzin e clomazone aplicados isoladamente. A média assim calculada foi comparada com a média do tratamento com associação de metribuzin e clomazone, pela comparação de dois tratamentos em amostras independentes quando  $n_1 = n_2$  (Steel & Torrie, 1980; Riboldi, 1993).

Tanto a comparação entre as médias dos quatro tratamentos, pelo teste Waller-Duncan (Figura 2.1), quanto a comparação entre a média estimada pela Equação 2.5, demonstram o maior nível de peroxidação lipídica do tratamento com a associação dos herbicidas metribuzin e clomazone. Mais uma vez, de forma alternativa à anterior, fica evidenciada a existência de sinergismo na associação de metribuzin e clomazone, ao nível da peroxidação lipídica, nas doses empregadas.

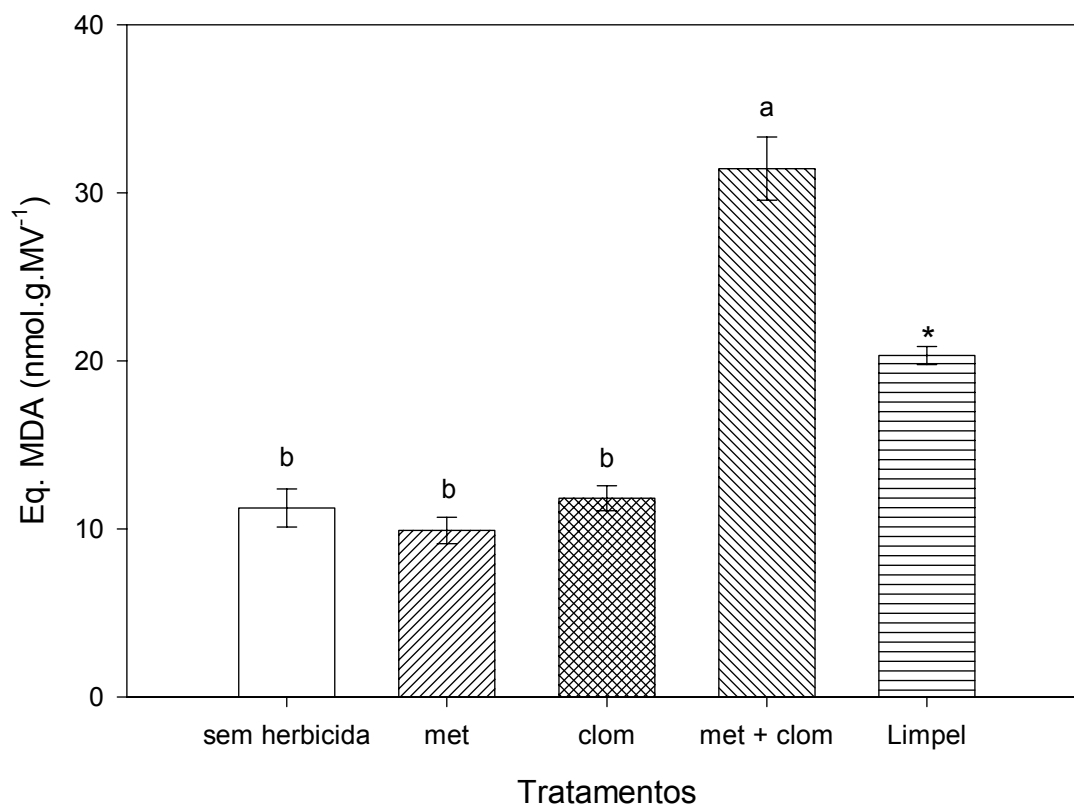


FIGURA 2.1. Equivalentes de MDA (eq. MDA) de folhas de girassol após tratamento com os herbicidas metribuzin (met) (0,28  $\mu\text{M}$ ) e clomazone (clom) (80  $\mu\text{M}$ ), aplicados isolados e em associação (nas mesmas doses) e valores esperados pela fórmula de Limpel ( $E = X + Y(100-X)/100$ ). Colunas abaixo de mesma letra não diferem ao nível de 5% de significância (teste Waller-Duncan) e barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. \*Inferior a met + clom (teste  $t$ ,  $P < 0,01$ ). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

A magnitude dos níveis de eq. MDA encontrados, variando entre 11 e 31  $\text{nmol.g.MV}^{-1}$ , está de acordo com os níveis encontrados em outros trabalhos (Velikova et al., 2000; Prochazkova et al., 2001). Experimento que avaliou o estresse salino em girassol apresentou valores entre 10 a 40  $\text{nmol.g.MV}^{-1}$  em raízes, colmos e calos das plantas (Vieira Santos et al., 2001). Trabalho sobre a senescência de folhas de espinafre, relatou valores entre 10 e 40  $\text{nmol.g.MV}^{-1}$  (Hodges & Forney, 2000).

A intensidade do estresse oxidativo provocado pela associação de metribuzin e clomazone fica ainda mais evidente quando se observa que os herbicidas aplicados isoladamente não produziram mais peroxidação lipídica do que a normalmente encontrada em plantas não tratadas (Figura 2.1). Isto demonstra que as doses utilizadas foram inferiores às doses  $I_{50}$  pretendidas, o que ressaltou o resultado obtido com a associação dos produtos, devido, provavelmente, à sua ação recíproca e potencializadora.

#### **2.4.2. Análise do extravasamento eletrolítico**

Outra forma escolhida para analisar o efeito da associação dos herbicidas pelo estresse oxidativo provocado, foi medir o extravasamento eletrolítico de discos foliares tratados com os herbicidas. O efeito final da ação herbicida, tanto do metribuzin, quanto do clomazone, ainda que seu mecanismo de ação primário seja distinto, é o estresse oxidativo. O resultado deste estresse é peroxidação das membranas celulares, que culmina com o extravasamento do conteúdo celular para o meio externo. A solução que receber este extravasamento terá sua condutividade eletrolítica aumentada, pela presença dos íons e compostos polares presentes no citosol. Portanto, quanto maior o estresse oxidativo, maior será a condutividade medida (Kenyon et al., 1985; Dayan et al., 1997; Li et al., 2000).

As curvas de resposta às doses obtidas no experimento preliminar de condutividade eletrolítica, indicam que para metribuzin a dose  $I_{50}$  encontrada foi de 12  $\mu\text{M}$ , equivalendo a uma condutividade estimada de 825  $\mu\text{mho}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Figura 2.2). O modelo log-logístico empregado ajustou adequadamente os resultados obtidos, produzindo coeficiente de determinação bastante elevado ( $R^2=0,98$ ), significando que grande parte da variabilidade da média de condutividade é

explicada pelo modelo. Para o herbicida clomazone, encontrou-se a dose  $I_{50}$  de 237  $\mu\text{M}$  e condutividade estimada de 883  $\mu\text{mho.cm}^{-1}$  (Figura 2.3). O ajuste do modelo log-logístico também foi adequado ( $R^2=0,99$ ) para ajuste dos resultados obtidos (Apêndice 11.6) (Riboldi, 1995b; Seefeldt, et al., 1995).

Discos foliares de girassol, submetidos aos tratamentos com metribuzin e clomazone, isolados ou associados, nas doses  $I_{50}$ , tiveram extravasamento do conteúdo celular, propiciando maior condutividade eletrolítica no tratamento com a associação dos herbicidas metribuzin e clomazone (Tabela 2.2). No método de análise estatística proposto por Flint et al. (1988), a estimativa da interação é maior do que zero, com alta significância estatística, o que indica ocorrer, nestas doses, o efeito de interação sinérgica entre os herbicidas metribuzin e clomazone. Trabalhos que utilizaram condutividade eletrolítica para avaliar o efeito de acifluorfen em pepino e sensibilidade de cultivares de soja ao sulfentrazone, obtiveram níveis semelhantes de condutividade, com 300  $\mu\text{mho.cm}^{-1}$  em pepino (apenas 5 horas de luz) e até 600  $\mu\text{mho.cm}^{-1}$  em soja (Kenyon et al., 1985; Dayan et al., 1997).

O índice de extravasamento eletrolítico relativo ( $I_e$ ), também apresenta estimativa da interação superior a zero, com elevada significância estatística ( $P<0,01$ ) (Tabela 2.2), confirmando o sinergismo na associação dos herbicidas metribuzin e clomazone, nas doses empregadas, ao nível celular.

A expressão dos dados pelo  $I_e$  tem por finalidade apresentar os resultados extraindo-se dos tratamentos os níveis observados na solução sem tratamento herbicida e em função da máxima condutividade produzida pelos discos foliares (em banho-maria com água fervente). Neste experimento a condutividade máxima média (quatro repetições) foi de 1272  $\mu\text{mho.cm}^{-1}$ . Esta transformação compensa

as diferenças potenciais entre tecidos, permitindo a comparação com outros trabalhos (Huang et al., 1997; Li et al., 2000).

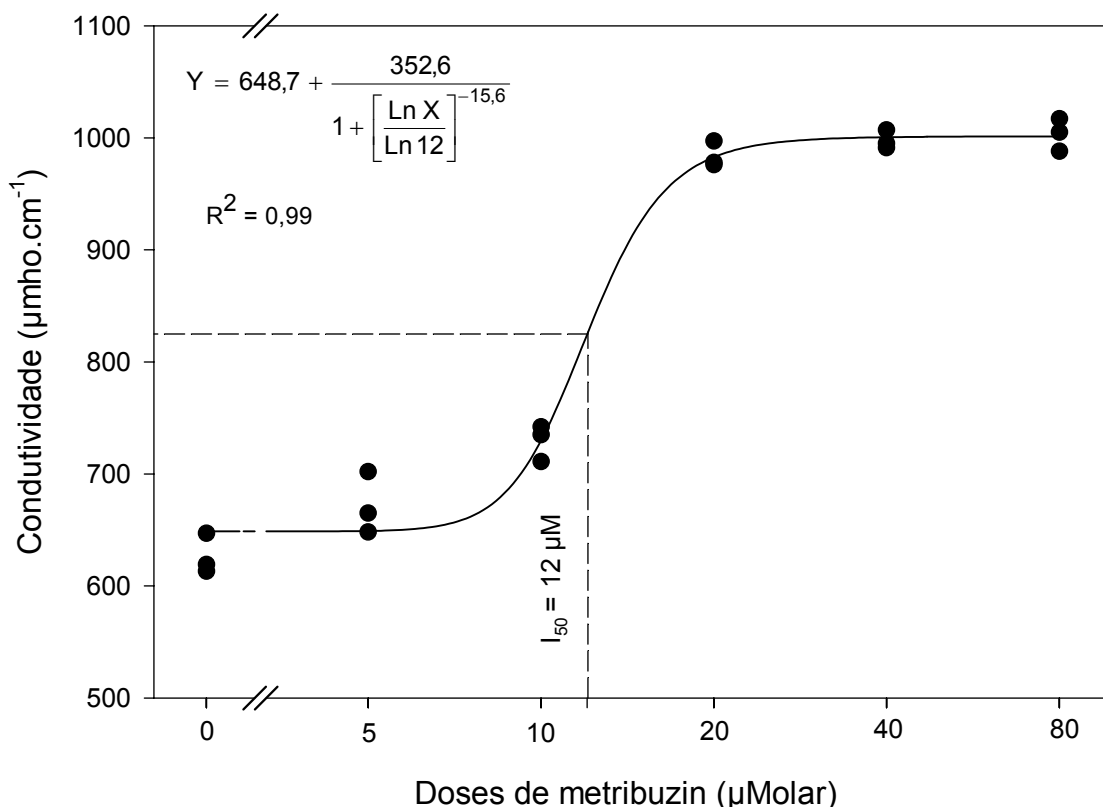


FIGURA 2.2. Curva de resposta às doses da condutividade eletrolítica de discos foliares de girassol, sob doses crescentes de metribuzin. A linha contínua representa a curva ajustada pelo modelo log-logístico e os pontos representam os valores originais de cada repetição. A dose necessária para obter 50% de resposta ( $I_{50}$ ), definida pelo modelo, está representada pela linha vertical tracejada. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Em trabalho que objetivou analisar a sensibilidade de cultivares de soja ao herbicida sulfentrazone, foram obtidos  $I_e$  que variaram de 0,8 para cultivares tolerantes, a 8,8 para cultivares sensíveis (Li et al., 2000). Estes resultados corroboram o emprego desta metodologia como forma de avaliação do efeito herbicida ao nível celular.

O procedimento adotado para a variável eq. MDA, de comparação dos valores estimados pela Equação 2.5, com os resultados do tratamento com a

associação metribuzin + clomazone também foi adotado para a variável  $I_e$ . Incluiu-se também o valor máximo de condutividade, obtido pela imersão da solução em banho-maria de água a 95°C. A comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste Waller-Duncan demonstra claramente o maior extravasamento eletrolítico provocado pela associação dos herbicidas, tanto em relação ao provocado pelos herbicidas isoladamente, como pelo efeito esperado, calculado pela fórmula de Limpel et al. (1962) (Figura 2.4) e comparado com a média do tratamento de associação pelo teste  $t$ .

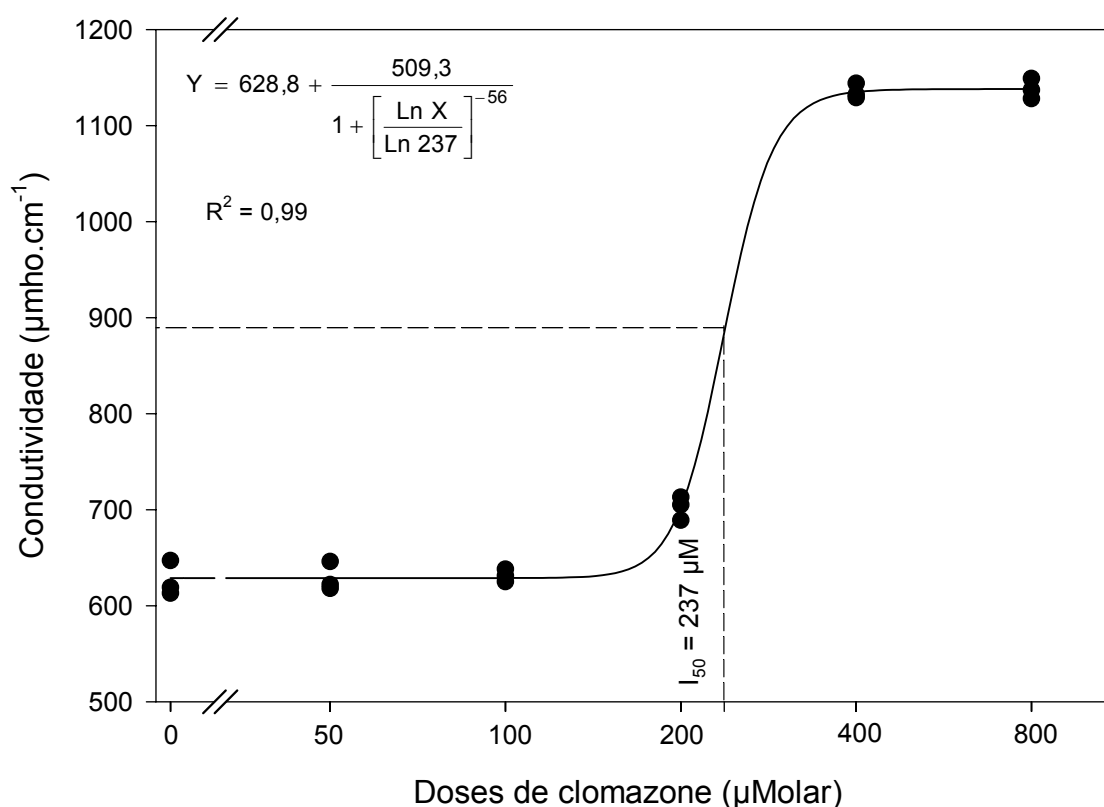


FIGURA 2.3. Curva de resposta às doses da condutividade eletrolítica de discos de folhas de girassol, sob doses crescentes de clomazone. A linha contínua representa a curva ajustada pelo modelo log-logístico e os pontos representam os valores originais de cada repetição. A dose necessária para obter 50% de resposta ( $I_{50}$ ), definida pelo modelo, está representada pela linha vertical tracejada. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

TABELA 2.2. Condutividade eletrolítica de discos foliares de girassol, em resposta à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Tratamentos	Condutividade eletrolítica	
	( $\mu\text{mho.cm}^{-1}$ )	$I_e$ <sup>1</sup>
Tratamento sem herbicida	653	0,0
Metribuzin 12 $\mu\text{M}$	701	1,8
Clomazone 237 $\mu\text{M}$	681	1,1
Metribuzin + clomazone	962	11,8
Estimativa da interação <sup>2</sup>	0,12 <sup>3</sup>	8,89
Probabilidade ( $t_{\text{calc.}} > t_{\text{tab.}}$ )	<0,01	<0,01
CV (%) <sup>4</sup>	0,51	24,56

<sup>1</sup> Índice de extravasamento eletrolítico relativo:  $I_e = 100(R_1 - R_0(1-R_0))$  onde  $R_1$  é a razão entre a condutividade de discos tratados e a máxima possível e,  $R_0$ , a razão entre a dos discos não tratados e a máxima possível (máxima média de  $1272 \mu\text{mho.cm}^{-1}$ ).

<sup>2</sup>  $I_{ij} = \mu_{ij} - \mu_{i0} - \mu_{0j} + \mu_{00}$ , onde  $I_{ij}$  = estimativa da interação segundo Flint et al. (1988);  $\mu_i$  = efeito dos herbicidas em associação;  $\mu_{i0}$  e  $\mu_{0j}$  = efeito dos herbicidas aplicados isoladamente;  $\mu_{00}$  = efeito dos níveis 0 dos herbicidas. Se  $I_{ij} > 0 \Rightarrow$  interação sinérgica; se  $I_{ij} = 0 \Rightarrow$  interação aditiva e se  $I_{ij} < 0 \Rightarrow$  interação antagônica, todos quando a probabilidade de  $t_{\text{calc.}} > t_{\text{tab.}} < 0,05$ .

<sup>3</sup> Valores transformados para logaritmo decimal.

<sup>4</sup> Desvio padrão relativo.

Verifica-se que mesmo a associação dos herbicidas não provocou o máximo extravasamento possível (Figura 2.4). Especula-se que poderia ter-se deixado transcorrer mais tempo de incubação no período luminoso, ou com maior intensidade de luz para se acentuar o extravasamento do conteúdo celular. Em trabalho em intensidade de luz semelhante à empregada no presente trabalho, em que foram testados vários tempos de incubação, o período de 36 horas permitiu o máximo extravasamento, mas representou apenas 73% do obtido com o tratamento de banho-maria (Li et al., 2000). Vale considerar que o tratamento com o banho-maria serve como referência para poder calcular-se o  $I_e$  e não necessariamente deve ser atingido pelos tratamentos herbicidas (Huang et al., 1997; Li et al., 2000).



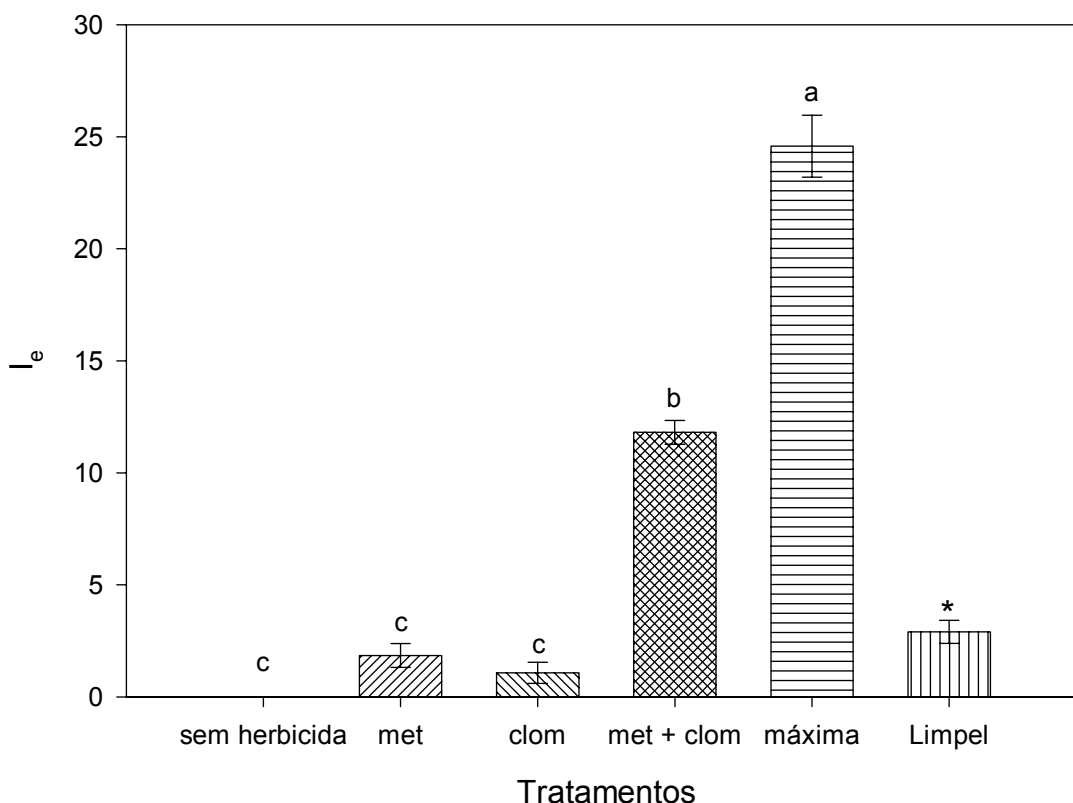


FIGURA 2.4. Índice de extravasamento eletrolítico ( $I_e$ ) de discos foliares de girassol (*Helianthus annuus*) após tratamento com os herbicidas metribuzin (met) ( $12 \mu\text{M}$ ) e clomazone (clom) ( $237 \mu\text{M}$ ), aplicados isolados e em associação e valores esperados pela fórmula de Limpel et al. (1962) ( $E = X + Y(100-X)/100$ ). Colunas abaixo de mesma letra não diferem ao nível de 5% de significância (teste Waller-Duncan) e barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento. \*Inferior a met + clom (teste  $t$ ,  $P < 0,01$ ). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Já os tratamentos com os herbicidas aplicados isoladamente equivaleram-se entre si e com o tratamento sem herbicida. Este resultado, de certa forma, se deve à forma de calcular o  $I_e$ , que toma o máximo extravasamento como referência para expressão dos demais, o que reduz ainda mais as diferenças de baixa magnitude.

A análise conjunta dos resultados de eq. MDA e condutividade eletrolítica, como forma de estimar o estresse oxidativo provocado pelos herbicidas metribuzin e clomazone, aplicados isolados e em associação, permite detectar a

existência de interação sinérgica na ação conjunta destes herbicidas, pelo menos entre os dois conjuntos de doses empregados em cada um dos trabalhos. Os resultados de eq. MDA asseguram a estimativa do estresse oxidativo por um parâmetro bioquímico, já que o MDA é o composto resultante da peroxidação lipídica, gerada pelo estresse. Em complemento a estes, os resultados de condutividade eletrolítica estimam o estresse através de um parâmetro físico-químico, consequência do primeiro, uma vez que o rompimento das membranas causa o extravasamento eletrolítico. Portanto, são duas formas de medir a ação dos herbicidas na sua capacidade de destruir as membranas do vegetal e atingir seu objetivo. Ambas variáveis demonstraram que a ação de um herbicida é facilitada pelo outro, confirmando a hipótese de que a redução da capacidade protetora da planta pelo herbicida inibidor da síntese de carotenóide, facilita a ação geradora de estresse oxidativo, pelo herbicida inibidor do fluxo de elétrons do FS II.

## **2.5. CONCLUSÕES**

Os herbicidas metribuzin e clomazone, aplicados em associação, nas doses de 0,28 e 80  $\mu\text{M}$ , respectivamente, em solução nutritiva de cultivo de plântulas de girassol, provocam níveis de equivalente MDA superiores aos provocados por suas aplicações isoladas. A magnitude da diferença é de tal ordem que configura a existência de interação sinérgica da associação, nas doses testadas.

Os herbicidas metribuzin e clomazone, aplicados em associação, nas doses de 12 e 237  $\mu\text{M}$ , respectivamente, em solução com discos foliares de girassol, causam extravasamento eletrolítico superior ao esperado a partir dos

efeitos obtidos com a aplicação isolada. Neste caso o tipo de interação existente é caracterizada como sinérgica.

O estresse oxidativo em plântulas de girassol, decorrente da aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone aplicados associados, estimado pelos níveis do metabólito resultante da peroxidação lipídica, o malondialdeído e pela ruptura das membranas celulares, através do extravasamento eletrolítico, comprova a existência de sinergismo nesta associação, nas doses empregadas.

### **3. CAPÍTULO II - MODIFICAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS EM CLOROPLASTOS DE GIRASSOL (*Helianthus annuus*), EM DECORRÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DOS HERBICIDAS METRIBUZIN E CLOMAZONE**

#### **3.1. RESUMO**

As interações que determinam os efeitos da associação de dois ou mais herbicidas podem ser investigadas com o estudo das modificações ultra-estruturais sofridas nos cloroplastos. Foi conduzido experimento com a aplicação dos herbicidas metribuzin a 25 g.ha<sup>-1</sup> e clomazone a 275 g.ha<sup>-1</sup>, isolados e em associação, sobre plantas de girassol, em pós-emergência, com a adição de óleo mineral Assist a 0,5% (v.v<sup>-1</sup>). O material coletado das folhas sofreu preparação adequada para obtenção de eletromicrografias com microscópio eletrônico de transmissão (MET). Das imagens, foram obtidas medidas de comprimento, largura, área do cloroplasto e área do sistema grana-tilacóides. A análise das imagens obtidas, da razão comprimento.largura<sup>-1</sup> e da relação área do sistema grana-tilacóides.área do cloroplasto<sup>-1</sup> forneceu evidências de que os herbicidas isolados produziram dano moderado nos cloroplastos. Já a associação dos herbicidas produziu dano severo, provocando a destruição dos tilacóides e o rompimento do envelope. Conclui-se que a associação destes herbicidas apresenta ação potencializada em relação à ação de cada herbicida aplicado isoladamente.

### 3.2. INTRODUÇÃO

As modificações provocadas por herbicidas ao nível ultra-estrutural, nas células, seus cloroplastos, mitocôndrias e outras organelas têm sido investigadas a fim de contribuir para o entendimento de seu mecanismo de ação. As alterações anatômicas observadas com o auxílio de microscópio eletrônico de transmissão complementam e confirmam os estudos conduzidos ao nível bioquímico e fisiológico. Da mesma forma, as interações decorrentes do uso associado de dois ou mais herbicidas podem ser melhor compreendidas quando as avaliações realizadas incluem estudos das modificações ultra-estruturais, como verificado em diversos estudos sobre o mecanismo de ação de herbicidas (Hill et al., 1968; Pallett & Dodge, 1980; Ashton & Crafts, 1981; Fayez, 2000).

A forma e o tamanho dos cloroplastos são variáveis de acordo com a idade da planta, sua atividade metabólica e condições ambientais. Os cloroplastos são envolvidos por uma dupla membrana denominada envelope, que delimita seu conteúdo interior. Nela estão contidos o estroma, matriz do plastídio que envolve o sistema de membranas, os tilacóides, que abrigam os complexos de captação de luz e fotossistemas I e II e o conjunto de tilacóides formando vesículas empilhadas, os grana (Hill et al., 1968; Ashton & Crafts, 1981; Molas, 2001).

A estrutura dos cloroplastos pode ser bastante alterada por ação dos herbicidas. Estudos com herbicidas inibidores do fotossistema II (FS II), demonstram que o dano pode seguir uma escala progressiva de intensidade das modificações, de acordo com o herbicida, a dose empregada e o lapso de tempo entre a aplicação e a coleta do material. Inicialmente observa-se a mudança da forma elíptica ou discóide dos cloroplastos para a forma esférica. A seguir, desaparecem os grânulos de amido depositados no estroma e, após, os

plastoglóbulos, conjunto de grânulos encontrados nos plastídios que contém principalmente lipídios. O efeito seguinte envolve a desintegração dos tilacóides interlamelares, ou que estão entre as pilhas de grana, com a desorganização do arranjo dos grana, seguido do inchamento do compartimento interno das vesículas dos tilacóides, culminando com a desintegração total destes compartimentos expandidos e do envelope do cloroplasto (Hill et al., 1968; Pallett & Dodge, 1980; Ashton & Crafts, 1981; Bartels, 1985; Armbruster et al., 1993; Fayez, 2000; Molas, 2001).

Diversos trabalhos que envolvem o estudo detalhado do efeito provocado pelos herbicidas tem se valido das técnicas de microscopia eletrônica. Eletromicrografias de cloroplastos de capim-arroz tratado com atrazine, degradação de tilacóides pelo tratamento de várias espécies com amitrole, e comprovação do mecanismo de ação e seletividade de vários inibidores do FS II são exemplos da aplicação deste recurso no conhecimento da ação herbicida (Hill et al., 1968; Pallett & Dodge, 1980; Ashton & Crafts, 1981; Kenyon et al., 1985; Armbruster et al., 1993; Fayez, 2000; Molas, 2001).

O presente trabalho foi realizado visando analisar os efeitos da associação de herbicidas inibidores do FS II, como o metribuzin, com inibidores da síntese de carotenóides, como o clomazone, ao nível ultra-estrutural.

### **3.3. MATERIAL E MÉTODOS**

Plantas de girassol, híbrido DKB 11, foram cultivadas durante o mês de agosto, em quatro bandejas de 25 x 40 x 10 cm, com solo peneirado, até o estágio de três pares de folhas verdadeiras. A análise físico-química do solo

utilizado indicou 290 g.kg<sup>-1</sup> de argila, 19 g.kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, 25 mg.dm<sup>-3</sup> de P, 123 mg.dm<sup>-3</sup> de K e pH (H<sub>2</sub>O:solo 1:1) de 6,0.

As doses empregadas dos herbicidas foram escolhidas a fim de propiciar, nas aplicações isoladas de cada herbicida, dano em torno de 50%, para permitir a comparação dos efeitos provocados pela associação dos produtos. Foram então aplicados os tratamentos herbicidas sobre cada bandeja, em pós-emergência, com metribuzin na dose de 25 g.ha<sup>-1</sup>, clomazone na dose de 275 g.ha<sup>-1</sup> e a associação de ambos nessas mesmas doses. Em todas aplicações foi adicionado óleo mineral parafínico (Assist) 0,5% (v.v<sup>-1</sup>). A aplicação foi realizada ao final do dia, com pulverizador costal pressurizado a CO<sub>2</sub>, utilizando-se barra com quatro bicos de jato plano tipo "leque" 8002 XR, espaçados 50 cm e consumo de calda equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup>. A temperatura do ar era de 27°C e a umidade relativa de 67%.

Nos três dias subseqüentes à aplicação, a radiação teve duração de 7 h 30 min, 6 h 54 min e 5 h 6 min (heliógrafo Fuess), respectivamente, com fluxo fotônico fotossintético equivalente a 500 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (sensor quântico acoplado a porômetro Li-Cor 1600). As plantas permaneceram em ambiente protegido (estufa plástica), com temperatura máxima média de 30°C, mínima média de 18°C e, quando do surgimento dos primeiros sintomas visuais nas folhas, três dias após a aplicação, coletou-se o material, ao final do dia, em folhas escolhidas ao acaso nas bandejas.

De cada tratamento, extraiu-se dois cubos de aproximadamente 0,5 x 0,5 x 1,0 mm, que foram imersos em solução fixadora primária, uma mistura de glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (Roland & Vian, 1991), à temperatura ambiente, por 24 horas. As amostras foram

lavadas em tampão fosfato de mesma osmolaridade e pH (3 lavagens de uma hora cada) e transferidas para uma mistura (1:1) de tetróxido de ósmio 2% e ferricianeto de potássio 0,8% ( $K_3Fe(CN)_6$ ) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (Weber, 1992), por 12 horas, à temperatura ambiente e no escuro. Após lavagem em água destilada, durante uma hora, o material foi desidratado em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%; 15 minutos cada), com a adição de acetato de urânio 2% em acetona 70%, à temperatura ambiente.

Como meio de inclusão, foi utilizada a resina epóxi de baixa viscosidade Spurr (Spurr, 1969). A resina pura foi adicionada a cada 10 minutos, gota a gota, em acetona contendo as amostras desidratadas, até a obtenção de uma mistura numa proporção de 1:1. As amostras foram mantidas nessa mistura por 24 horas, em agitador mecânico rotativo. A seguir, as amostras foram transferidas para uma mistura de resina Spurr e acetona numa proporção de 3:1, por 24 horas e, finalmente, para resina pura, durante 72 horas, sob agitação constante. As amostras foram polimerizadas em resina pura no interior de cápsulas de gelatina em estufa aquecida a 70°C, durante 18 horas.

Seções ultrafinas, com 70 a 90 nanômetros (nm) de espessura, foram obtidas em ultramicrótomo Leica Ultracut UCT, equipado com navalha de diamante. As seções foram montadas em suportes de cobre ("grids") de abertura oval de 1x2 mm, previamente recobertos com um filme Butvar-B-98 (terpolímero de polivinil-butil, polivinil-álcool e polivinil-acetato, a partir de solução com concentração de 0,25% em clorofórmio).

As seções ultrafinas foram contrastadas com a reação de Thiéry modificada (Thiéry, 1967; Weber, 1996), seguida de solução de chumbo (Hanaichi et al., 1986), por cinco minutos. As eletromicrografias foram realizadas em



microscópio eletrônico de transmissão (MET) Jeol JEM 1200 EX-II, sob 80 kV, equipado com negativos Kodak Electron Microscopy Film 4489.

A partir das imagens obtidas dos negativos, foram realizadas medições de comprimento, largura, área dos cloroplastos e área do sistema grana-tilacóides, através do aplicativo computacional “Jandel SigmaScan”. Este aplicativo permite selecionar o sistema grana-tilacóides pela diferença de intensidade da cor cinza entre o sistema e o estroma dos cloroplastos. Foram então calculadas a razão comprimento.largura<sup>-1</sup> dos cloroplastos, dada pelo quociente entre comprimento e largura, tomada individualmente; e a relação área do sistema grana-tilacóides.área do cloroplasto<sup>-1</sup>, dada pelo quociente entre a área do sistema grana-tilacóides e a área do cloroplasto, expressa em porcentagem, também tomada individualmente.

De cada tratamento, foram obtidas três imagens, correspondentes a três diferentes células nas seções ultrafinas preparadas, o que representou as repetições. As variáveis obtidas sofreram análise de variância em classificação simples e teste de comparação de médias (DMS ou teste *t*, com nível de significância a 5%). A variável “área do sistema grana-tilacóides” sofreu transformação  $\sqrt{x+1}$  (Riboldi, 1995).

### 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As eletromicrografias das células de folhas de girassol sem nenhum tratamento herbicida encontram-se na Figura 3.1. A Figura 3.1A mostra célula com um cloroplasto de aspecto característico, elíptico ou discóide, circundado por várias mitocôndrias. São evidentes o sistema de grana e tilacóides, o estroma, que envolve este sistema e o envelope, a membrana que delimita o cloroplasto. O

aspecto apresentado corresponde ao verificado em cloroplastos de tecidos verdes com atividade fotossintética e metabólica normais (Casadoro & Rascio, 1979; Fahh, 1982; Freeman et al., 1985; Buchanan et al., 2001b).

Na Figura 3.1B, observa-se um cloroplasto em destaque, evidenciando o sistema de membranas denominado de tilacóides que, na forma de vesículas empilhadas, forma os grana, unidos entre si pelos tilacóides interlamelares ou tilacóides do estroma. São também nitidamente visíveis dois grânulos de amido e vários plastoglóbulos, demonstrando que as folhas de girassol coletadas estavam, em plena atividade fotossintética e metabólica. O grande número de mitocôndrias na célula da Figura 3.1A reforça esta afirmação (Casadoro & Rascio, 1979; Buchanan et al., 2001b; Molas, 2002).

Outro aspecto de importância na Figura 3.1 é a forma dos cloroplastos ali visualizados. Ambos apresentam o formato elíptico ou discóide, forma referida na literatura como a usual dos cloroplastos em tecidos fotossinteticamente ativos (Casadoro & Rascio, 1979; Pallett & Dodge, 1980; Kim et al., 1997).

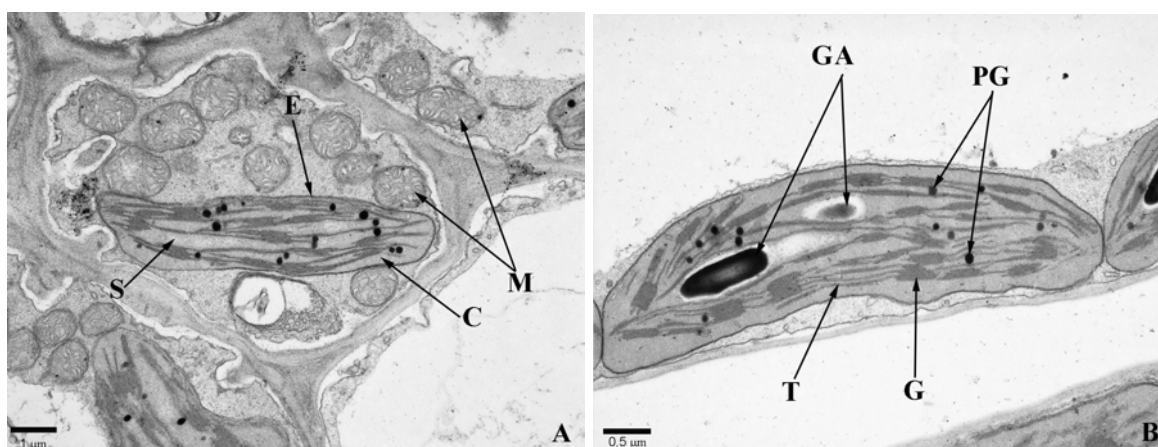


FIGURA 3.1. Eletromicrografias de células de folhas de girassol (*Helianthus annuus*); A: C = cloroplasto; M = mitocôndrias; E = envelope; S = estroma; B: G = pilha de grana; T = tilacóide; GA = grânulos de amido; PG = plastoglóbulos. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

A descrição quantitativa deste formato discóide é dada pelas medidas de comprimento e largura destes cloroplastos (Tabela 3.1). O comprimento médio dos cloroplastos avaliados, bem superior à sua largura, caracteriza o seu formato elipsóide. Isto fica demonstrado pela razão comprimento.largura<sup>-1</sup> (Tabela 3.1), que expressa a diferença entre as duas dimensões e que serve de referência para a avaliação do efeito dos tratamentos herbicidas sobre a forma dos cloroplastos. Nestes cloroplastos, o comprimento foi, em média, 4,33 vezes superior à largura.

Na Tabela 3.2 encontram-se as médias de área do cloroplasto, área do sistema grana-tilacóides e a relação área do sistema grana-tilacóides.área do cloroplasto<sup>-1</sup> (AGT.AC<sup>-1</sup>). A área do cloroplasto fornece parâmetro para o tamanho do cloroplasto que, apesar de bastante variável, permite a comparação com as alterações que os tratamentos herbicidas possam provocar. Da mesma forma, a área do sistema grana-tilacóides permite quantificar a extensão deste sistema, servindo de critério para avaliação do efeito dos herbicidas sobre o dano às membranas dos tilacóides.

TABELA 3.1. Médias de comprimento, largura e da razão comprimento.largura<sup>-1</sup> de cloroplastos de girassol, em resposta à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Tratamentos	Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Razão comprimento.largura <sup>-1</sup>
Tratamento sem herbicida	5,3	1,2	4,33 a*
Metribuzin 25 g.ha <sup>-1</sup>	3,6	2,2	1,10 b
Clomazone 275 g.ha <sup>-1</sup>	2,8	3,4	1,26 b
Metribuzin + clomazone	3,2	2,9	1,12 b
Teste F (tratamentos)	1,75	1,64	86,96
Probabilidade	0,235	0,256	< 0,0001
DMS <sub>0,05</sub>	2,73	2,36	0,55
CV (%) <sup>2</sup>	38,6	51,3	15,0

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste DMS ao nível de 5% de significância.

<sup>1</sup> Micrometro.

<sup>2</sup> Desvio padrão relativo.

TABELA 3.2. Médias de área do cloroplasto, área do sistema grana-tilacóides e da relação área do sistema grana-tilacóides.área do cloroplasto<sup>-1</sup> (AGT.AC<sup>-1</sup>) de cloroplastos de girassol, em resposta à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Tratamentos	Área do cloroplasto (µm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	Área do sistema grana-tilacóides <sup>2</sup> (µm <sup>2</sup> )	Relação AGT.AC <sup>-1</sup> (%) <sup>3</sup>
Tratamento sem herbicida	6,3	1,56 a*(1,5)	24,3 a
Metribuzin 25 g.ha <sup>-1</sup>	4,1	1,34 a (0,8)	19,4 ab
Clomazone 275 g.ha <sup>-1</sup>	5,0	1,30 a (0,7)	14,7 b
Metribuzin + clomazone	6,1	1,00 b (0,0)	0,0 c
Teste F (tratamentos)	0,25	7,64	16,00
Probabilidade	0,86	0,01	0,001
DMS <sub>0,05</sub>	6,72	0,27	8,55
CV (%) <sup>4</sup>	66,5	11,1	31,1

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste DMS ao nível de 5% de significância.

<sup>1</sup> Micrometro quadrado.

<sup>2</sup> Valores transformados por  $\sqrt{x + 1}$ ; médias originais entre parênteses.

<sup>3</sup> Área do sistema grana-tilacóides dividida por área do cloroplasto vezes 100.

<sup>4</sup> Desvio padrão relativo.

Já a relação AGT.AC<sup>-1</sup>, que expressa a área do sistema grana-tilacóides em porcentagem da área do cloroplasto, permite comparar o efeito dos herbicidas, extraindo-se a variação natural de tamanho, já que cloroplastos de menor área, proporcionalmente também deverão ter menor área do sistema grana-tilacóides.

Na Figura 3.2 encontram-se os cloroplastos de folhas tratadas com metribuzin (Figura 3.2A) e clomazone (Figura 3.2B). O tratamento com 25 g.ha<sup>-1</sup> de metribuzin provocou mudanças ultra-estruturais bastante visíveis. Na célula em destaque da Figura 3.2A, os vários cloroplastos exibem formato modificado, tendendo mais para o circular ou esférico, do que discóide (Tabela 3.1).

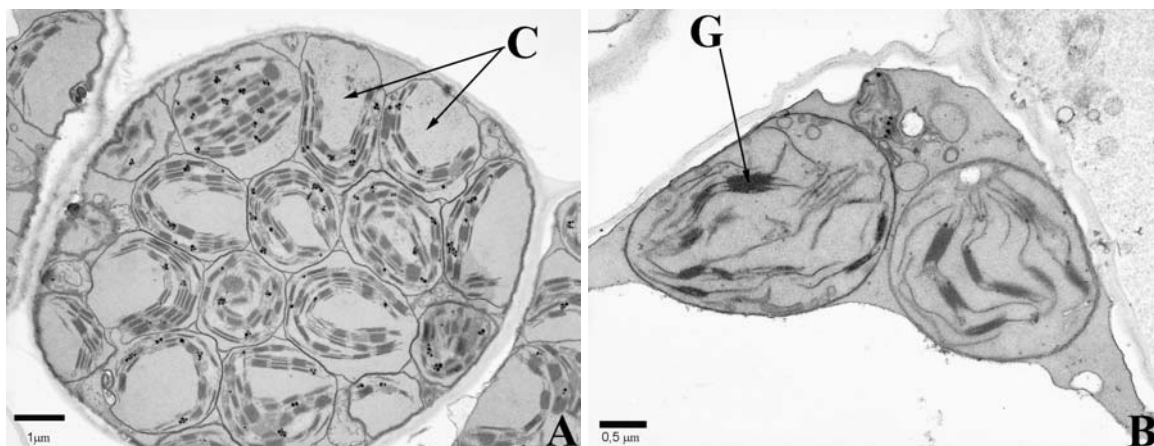


FIGURA 3.2. Eletromicrografias de folhas de girassol (*Helianthus annuus*) após tratamento com os herbicidas (A) metribuzin ( $25 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) e (B) clomazone ( $275 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ ); A: C = cloroplasto; B: G = grana. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

As dimensões comprimento e largura do cloroplasto não demonstraram diferença significativa. Mas, a razão entre ambas variáveis mostra a mudança da forma dos cloroplastos quando a planta foi tratada com metribuzin, comparando-se com cloroplastos de plantas não tratadas (Tabela 3.1). A mudança na forma do cloroplasto tem sido considerado como a primeira alteração na seqüência de alterações ultra-estruturais provocadas por herbicidas inibidores da fotossíntese (Hill et al., 1968; Pallett & Dodge, 1980; Bartels, 1985).

Também o sistema grana-tilacóides teve alterado seu arranjo espacial, normalmente distribuído ao longo da maior dimensão, assumindo conformação concêntrica (Figura 3.2), bem diferenciada da disposição vista nos cloroplastos sem tratamento herbicida da Figura 3.1. Isto poderia estar ligado à alteração na forma do cloroplasto, em que o arranjo das membranas parece acompanhar a forma esférica do cloroplasto. Mas no tratamento descrito a seguir, com clomazone, a forma também foi alterada para esférica, mas o arranjo espacial do sistema grana/tilacóide apresentou orientação diferente da concêntrica, demonstrada pelo tratamento com metribuzin. É provável que esta orientação das membranas esteja, então, relacionada diretamente ao mecanismo de ação dos

herbicidas, diferente entre o metribuzin (inibidor do FS II) e clomazone (inibidor da síntese de carotenóides).

Outra modificação provocada pelo metribuzin foi a ausência dos grânulos de amido (Figura 3.2), o que indica redução do processo fotossintético. Mas os plastoglóbulos ainda estão visíveis, o que demonstra ter sido mantido o acúmulo de lipídios, apontando para a perda parcial da atividade do cloroplasto. Estas alterações também foram encontradas em outros trabalhos (Hill et al., 1968; Ashton & Crafts, 1981; Wrischer, 1992), que relatam serem as mudanças na forma dos cloroplastos as primeiras a ocorrer como efeito da ação de herbicidas inibidores do FS II, para as menores doses e após os curtos intervalos de tempo entre aplicação e coleta do material.

A ausência de grânulos de amido, com ou sem a presença de plastoglóbulos, tem sido considerada como o passo seguinte na seqüência de modificações ultra-estruturais (Hill et al., 1968; Pallett & Dodge, 1980; Bartels, 1985). Outras alterações, como a substituição dos grana por membranas linear circulares, não foram observadas, o que reforça resultados que demonstram serem os efeitos de doses sub-letais diferentes das doses letais e que a dose empregada foi uma dose subletal (Bartels, 1985). De fato, a dose empregada de metribuzin foi dimensionada com a intenção de ser dose subletal, justamente para permitir a avaliação dos efeitos da associação deste herbicida com o clomazone.

O dano provocado pelo herbicida metribuzin acima relatada, advém de seu mecanismo de ação, como inibidor do FS II. A ligação deste herbicida à proteína D1, integrante do FS II, no lugar onde deveria ligar-se a quinona B, para dar continuidade ao fluxo de elétrons entre os fotossistemas, bloqueia o mesmo (Tietjen et al., 1991). A interrupção do fluxo de elétrons gera clorofila reativa,

formadora de radicais livres, responsáveis pela peroxidação das membranas. Os carotenóides produzidos pela planta reagem com a clorofila reativa, dissipando seu excesso de energia na forma de calor, protegendo a planta contra o estresse oxidativo. A dose de metribuzin deve então ser suficiente para produzir mais clorofila reativa do que os carotenóides possam neutralizar. Quando a dose empregada é inferior à necessária para superar toda a capacidade de neutralização dos carotenóides, o dano é parcial (Devine et al., 1993a; Devine et al., 1993b; Devine et al., 1993c), como verificado nos efeitos deste tratamento com metribuzin aplicado isolado (Figura 3.2A versus Figura 3.1).

Os efeitos provocados pelo tratamento com  $275 \text{ g.ha}^{-1}$  de clomazone podem ser visualizados na Figura 3.2B e nas Tabelas 3.1 e 3.2. A forma dos cloroplastos também passou de discóide para esférica ou regular, como demonstrado pela razão  $\text{comprimento.largura}^{-1}$  (Tabela 3.1). Os grânulos de amido não estão presentes e também não estão presentes os plastoglóbulos, demonstrando um efeito de intensidade maior do que no tratamento com metribuzin. Isto fica confirmado ao analisar-se o sistema grana-tilacóides, que exhibe aparência modificada (Figura 3.2B) em relação ao tratamento sem herbicida (Figura 3.1) e em relação ao tratamento com metribuzin (Figura 3.2A). As membranas assumiram orientação mais linear do que concêntrica, dispendo-se de forma mais paralela a um mesmo plano.

As medidas expressas na Tabela 3.2, também atestam as alterações e sua intensidade. Embora a área do cloroplasto para os tratamentos com clomazone não difira do tratamento com metribuzin ou testemunha, a área do sistema grana-tilacóides é numericamente inferior ao tratamento sem herbicida e equivalente ao tratamento com metribuzin, atestando o dano provocado nas membranas. A

relação  $AGT.AC^{-1}$  demonstra esta situação de forma mais evidente. O valor obtido para este tratamento foi inferior ao sem herbicida, evidenciando redução no conjunto de grana e tilacóides sem, contudo, diferir do tratamento com metribuzin.

Vários trabalhos confirmam alterações ao nível dos cloroplastos de plantas tratadas com clomazone em padrão semelhante ao obtido, com figuras de aparência bem semelhante, tanto na forma dos cloroplastos, como no arranjo do sistema grana-tilacóides (Bartels, 1985; Duke et al., 1985). A intensidade dos efeitos no tratamento com clomazone pode ser atribuída a duas causas. Primeiro, a dose empregada do herbicida clomazone sugere diferente sensibilidade do girassol aos produtos testados, sendo bem mais sensível ao metribuzin do que ao clomazone (Halstead & Harvey, 1988; Johnson & Talbert, 1993; Lyon & Anderson, 1993). Segundo, ao mecanismo de ação do herbicida clomazone. Embora o modo de ação final seja semelhante ao do metribuzin (o estresse oxidativo), sua ação inicial é bastante diversa deste e consiste em inibir a rota de biossíntese dos carotenóides. Com o nível de carotenóides reduzido, não há neutralização da clorofila reativa normalmente formada (alta luminosidade e/ou baixa temperatura) e são produzidas as formas reativas de oxigênio, provocando peroxidação dos lipídios e destruição das membranas. Em última análise, o dano final é o mesmo. Ocorre que os herbicidas podem também apresentar outros efeitos, além do fato que, para o clomazone, ainda não foi encontrada a enzima inibida pelo herbicida. Sua ação inclui também a inibição da fitilização da clorofila, último passo da síntese da clorofila, onde o anel tetrapirrólico liga-se à cauda fitol, o que causa sua redução ou ausência nos tecidos tratados ("bleaching") (Devine et al., 1993b; Scott et al., 1994; Buchanan et al., 2001a).



Mas mesmo assim, as alterações provocadas por este tratamento situam-se no início da seqüência de alterações ultra-estruturais previstas, o que pode ser entendido levando-se em conta que a dose empregada foi dimensionada para não provocar dano total. A dose empregada é em torno de quatro vezes menor do que a dose necessária para destruir plântulas de girassol. Doses mais elevadas, inibiriam completamente a síntese de carotenóides e o estresse oxidativo normalmente produzido, provavelmente destruiria completamente as membranas.

Os tratamentos com aplicação de clomazone e metribuzin isolados provocaram efeitos que podem ser classificados como dano moderado (Figura 3.2), tomando-se por base a seqüência de alterações ultra-estruturais propostas por Ashton & Crafts (1981). Em ambos tratamentos herbicidas houve alteração da forma discóide para a forma esférica, como demonstrado pela razão comprimento.largura<sup>-1</sup> destes tratamentos, inferior à razão encontrada nos cloroplastos de folhas sem aplicação de herbicida (Tabela 3.1). Também houve alteração do sistema grana-tilacóides, embora em magnitude que pode ser considerada moderada, já que o tratamento com metribuzin, no valor da relação AGT.AC<sup>-1</sup>, foi equivalente ao sem herbicida e o tratamento com clomazone, embora inferior ao tratamento sem herbicida.

No tratamento com a associação dos herbicidas metribuzin e clomazone verifica-se dano bem mais pronunciado e próxima da destruição total do plastídio (Figura 3.3). Os cloroplastos das folhas submetidas a esta associação também tiveram sua forma alterada, de esférica para circular ou irregular (Tabela 3.1), não apresentaram grânulos de amido e plastoglóbulos e tiveram seu sistema grana-tilacóides completamente destruído (Tabela 3.2). O passo seguinte na seqüência progressiva de efeitos seria o rompimento do envelope e perda completa da

função celular. Este efeito começou a ocorrer, como pode ser observado principalmente na Figura 3.3A.

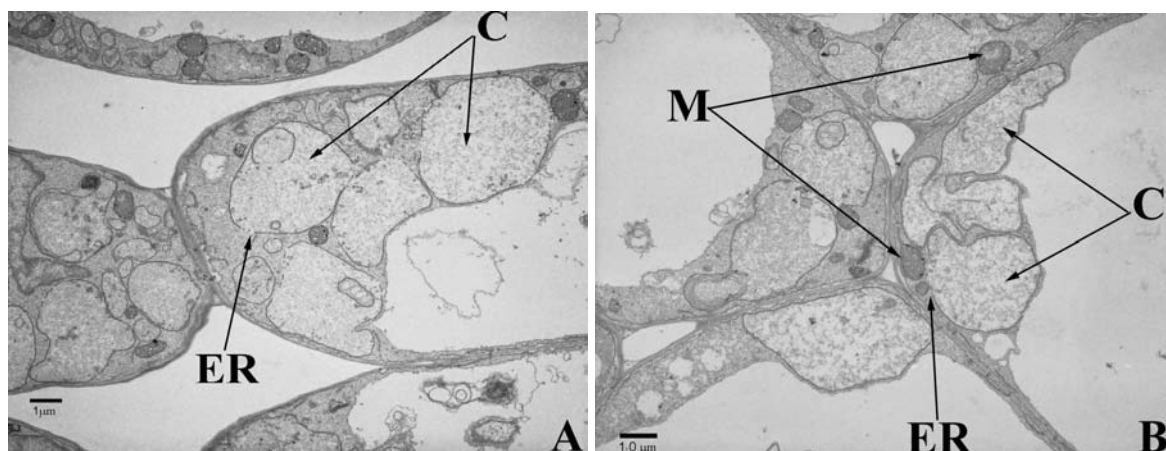


FIGURA 3.3. Eletromicrografias de folhas de girassol (*Helianthus annuus*) após tratamento com a associação dos herbicidas metribuzin ( $25 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) e clomazone ( $275 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ ); A: C = cloroplasto; ER = envelope rompido; B: M = mitocôndrias. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

A destruição do sistema de membranas, chamado de tilacóides, e de suas vesículas empilhadas, os grana, ocorre diretamente em função do mecanismo de ação dos herbicidas empregados. Enquanto o metribuzin, bloqueando o transporte de elétrons da fotossíntese, produz formas altamente reativas de oxigênio, com peroxidação dos lipídios das membranas, o clomazone inibe a síntese dos carotenóides, que atuam na dissipação do excesso de energia que produz estes radicais livres (Devine et al., 1993c).

Portanto, a associação dos herbicidas metribuzin e clomazone, em doses que, isoladamente, promovem dano moderado, torna-se bem mais agressiva, com o metribuzin produzindo formas reativas de oxigênio e o clomazone reduzindo a defesa natural da planta à formação destes radicais. A dose de  $25 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$  de metribuzin, insuficiente para superar as defesas naturais, quando isolado, em associação com  $275 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$  de clomazone, consegue superá-las, porque este último atua justamente na redução destas defesas. O nível de clorofila reativa provocado pelo metribuzin, antes insuficiente para gerar estresse oxidativo fatal,

agora, com menos carotenóides neutralizadores, por inibição do clomazone, é capaz de destruir o sistema grana-tilacóides e iniciar a ruptura das membranas interna e externa (envelope) que revestem o cloroplasto (Capítulo I).

Analisando-se os tratamentos em conjunto na Tabela 3.1, verifica-se que o comprimento e largura não diferiram entre os tratamentos. Como pode ser observado, a variação natural encontrada entre os cloroplastos produziu desvios padrões relativos bastante elevados para estas variáveis, o que comprometeu o valor de F. Por outro lado, quando estas dimensões são expressas na forma de razão, eliminando-se em parte a variação, a alteração da forma do cloroplasto fica evidente. Os tratamentos herbicidas não diferiram entre si nesta razão, já que a alteração da forma dos cloroplastos já é percebida mesmo em baixas doses. Isto é, a forma discóide normal é uma das primeiras alterações percebidas e, mesmo danos maiores, não mais alterará o formato do cloroplasto, a não ser quando houver a sua destruição total.

O mesmo não ocorreu com as variáveis apresentadas na Tabela 3.2. Enquanto a área do cloroplasto não apresentou diferença entre os tratamentos, também pelas razões expostas para comprimento e largura, as demais mostraram diferença. A área do sistema grana-tilacóides foi equivalente entre os tratamentos sem herbicida e com metribuzin e clomazone aplicados isolados e foi inexistente no tratamento com a associação dos herbicidas. Da mesma forma, a relação  $AGT.AC^{-1}$  apresentou valor nulo para a associação dos herbicidas, expressando a destruição do sistema de membranas.

### 3.5. CONCLUSÕES

Os herbicidas metribuzin e clomazone, aplicados isoladamente, nas doses de 25 e 275 g.ha<sup>-1</sup>, respectivamente, em pós-emergência sobre plântulas de girassol, provocam, a nível ultra-estrutural, dano moderado, modificando a forma dos cloroplastos e seu acúmulo de amido e lipídios, mas preservando, ainda que parcialmente, o sistema de membranas grana-tilacóides.

Os herbicidas metribuzin e clomazone, aplicados em associação, nas doses de 25 e 275 g.ha<sup>-1</sup>, respectivamente, em pós-emergência sobre plântulas de girassol, provocam, a nível ultra-estrutural, dano severo, modificando a forma dos cloroplastos, eliminando o acúmulo de amido e lipídios e destruindo o sistema de membranas grana-tilacóides, com início de ruptura das membranas interna e externa dos cloroplastos.

A associação dos herbicidas metribuzin e clomazone potencializa o dano provocado nos cloroplastos pelos produtos isolados, passando de efeito moderado para efeito severo.

## **4. CAPÍTULO III - CURVAS DE RESPOSTA E ISOBOLOGRAMA COMO FORMA DE DESCREVER A ASSOCIAÇÃO DE HERBICIDAS INIBIDORES DO FOTOSISTEMA II E DA SÍNTESE DE CAROTENÓIDES**

### **4.1. RESUMO**

A metodologia de curvas de resposta e isobogramas, feitos a partir dos  $I_{50}$  gerados pelas curvas, tem sido bastante apregoada na demonstração de sinergismo. Foi conduzido experimento em casa-de-vegetação, com girassol cultivado em solução nutritiva (Hoagland), aplicando-se na solução 27 tratamentos, com os herbicidas metribuzin, nas doses de 0, 0,07, 0,14, 0,28, 0,56 e 1,13  $\mu$ Molar (M) e clomazone, nas doses de 0, 40, 80, 160, 320 e 640  $\mu$ M. Combinou-se as doses dos herbicidas de maneira a produzir os  $I_{50}$  das seis curvas resultantes das combinações. Nas plantas coletadas, cinco dias após, determinou-se o percentual de dano, a massa verde e a massa seca das plantas de girassol. Os seis pontos de  $I_{50}$  de cada variável foram utilizados para formar isobogramas, que apontaram probabilidade de em torno de 90% de pelo menos a associação de doses de clomazone com 140 nM de metribuzin serem sinérgicas, na variável massa seca.

### **4.2. INTRODUÇÃO**

A associação de dois ou mais herbicidas para o controle de plantas daninhas em uma mesma cultura tem sido prática bastante usual nas últimas

décadas. O tipo de interação decorrente da associação tem sido matéria de constante preocupação e investigação. Apesar de várias nomenclaturas terem sido adotadas para classificar estes tipos de interação, os termos aditividade, sinergismo e antagonismo tem sido os mais aceitos. Várias metodologias tem sido propostas e empregadas para a definição de qual tipo de interação ocorre em uma determinada associação. Mas na última década, tem se sobressaído na literatura proposição pelo uso de curvas de resposta às doses dos herbicidas e o uso de isobogramas para a definição do tipo de interação (Gowing, 1960; Hatzios & Penner, 1985; Green & Bailey, 1987; Gressel, 1990; Streibig et al., 1998; Streibig et al., 1999).

A curva de resposta às doses vem sendo bastante empregada não só no estudo de associações de herbicidas, mas também na comprovação de resistência de plantas a herbicidas e influência de fatores ambientais no seu desempenho. Consiste em descrever a resposta biológica de uma planta daninha às doses crescentes de um herbicida isolado e em associação, seguindo um fator constante de diluição, de forma que se obtenha doses eqüidistantes em escala logarítmica. Normalmente obtém-se uma curva simétrica em formato sigmoidal, que pode ser ajustada pelo modelo logístico. Deste ajuste obtém-se a estimativa da dose que provoca 50% do efeito total possível na variável resposta analisada (Chism et al., 1992; Streibig & Kudsk, 1993; Seefeldt et al., 1995; Blackshaw et al., 1996; Johnson & Young, 2002).

A representação gráfica das doses isoladas e em associação que causam 50% (ou outro percentual) de efeito ( $I_{50}$ ) de dois agentes químicos é chamada de isobograma. A descrição da ação conjunta de dois produtos por este método

permite que os princípios e problemas ligados à análise de associações possam ser claramente percebidos.

O isoblograma foi inicialmente empregado na farmacologia e trazido para a área de defensivos agrícolas por Tammes (1964). Segundo este autor, especialmente no estudo de sinergismo, esta representação pode ser de grande utilidade. No isoblograma, os  $I_{50}$  oriundos da aplicação isolada de cada um dos produtos são unidos, gerando a isobole de aditividade ou linha teórica de aditividade. Os demais  $I_{50}$  obtidos da associação em diferentes proporções dos produtos podem então ser analisados em relação a sua posição frente à isobole de aditividade. Se estes pontos posicionarem-se em torno da isobole de aditividade, a ação é de aditividade; se posicionarem-se abaixo, a ação é de sinergismo; se posicionarem-se acima, a ação é de antagonismo. A posição relativa destes pontos pode ser melhor avaliada com a representação dos intervalos de confiança entre os  $I_{50}$  obtidos. Assim, em torno da isobole de aditividade forma-se uma faixa de confiança e, em torno dos  $I_{50}$  das associações, intervalos de segurança, exprimindo a amplitude de variação da dose estimada (Tammes, 1964; Morse, 1978; Drury, 1980; Campbell et al., 1981; Green & Bailey, 1987; Streibig, 1987; Streibig & Kudsk, 1993; Gessner, 1995; Streibig et al., 1998).

Uma forma complementar de analisar-se as doses  $I_{50}$  para os produtos aplicados isolados e em associação é a do cálculo do índice de combinação ( $I_{comb}$ ). Este índice segue o princípio de aditividade de Loewe, que relaciona as doses  $I_{50}$  empregadas na associação com as doses  $I_{50}$  dos produtos isolados. O índice equivalente à unidade indica aditividade e, menor ou maior, indica sinergismo ou antagonismo, respectivamente (Ramakrishnan & Jusko, 2001).

As metodologias acima descritas podem ser de grande utilidade no esclarecimento da interação resultante da associação de herbicidas. Entre as diversas conseqüências advindas da associação, sem dúvida a existência de sinergismo é vantajosa, porque combina-se o espectro de ação dos herbicidas, previne-se o surgimento de resistência e aumenta-se a eficiência de controle, permitindo o uso de doses menores (Hatzios & Penner, 1985; Green, 1989; Gressel, 1990; Wrubel & Gressel, 1994). Nesse sentido, procurou-se, a partir do conhecimento dos vários mecanismos de ação dos herbicidas, dois mecanismos que pudessem apresentar sinergismo quando associados. Hipotetiza-se que, pela natureza de suas ações, herbicidas inibidores do fluxo de elétrons do fotossistema II (FS II) e herbicidas inibidores da síntese de carotenóides apresentem potencial de sinergismo. Enquanto os primeiros são geradores de estresse oxidativo, os segundos reduzem a capacidade da planta de combater este estresse. Assim, espera-se que a associação de herbicidas pertencentes a estes dois mecanismos de ação apresentem interação sinérgica como resultado de sua associação.

A fim de verificar a existência de sinergismo na associação de herbicidas inibidores do fluxo de elétrons no FS II e inibidores da síntese de carotenóides, conduziu-se o presente trabalho com a associação de metribuzin e clomazone, analisando-se a interação resultante com os métodos acima descritos.

### **4.3. MATERIAL E MÉTODOS**

Foi conduzido um experimento em ambiente protegido (estufa plástica), durante o mês de dezembro, com a finalidade de obter-se as curvas de resposta às doses de metribuzin e clomazone e os isobogramas correspondentes. Os tratamentos herbicidas foram aplicados na solução nutritiva onde cultivou-se



plântulas de girassol do híbrido DKB 11. Todo o procedimento de cultivo do girassol em solução nutritiva e aplicação dos tratamentos seguiu o descrito no Capítulo I.

As combinações necessárias para a obtenção das curvas de resposta totalizaram 27 tratamentos, em quatro repetições, com seis doses do herbicida metribuzin e seis doses de clomazone, em delineamento completamente casualizado. Para o metribuzin empregou-se as doses de 0, 70, 140, 280, 560 e 1120 nM. Para o clomazone empregou-se as doses de 0, 40, 80, 160, 320, e 640  $\mu\text{M}$ . As doses de 70 e 140 nM de metribuzin foram associadas com todas doses de clomazone. Da mesma forma, as doses de 40 e 80  $\mu\text{M}$  foram associadas com todas doses de metribuzin. Ao final do quinto dia após a aplicação dos tratamentos, determinou-se o dano nas plantas, valendo-se de escala percentual, onde 0% representou ausência de dano e 100%, morte das plantas (Frans & Crowley, 1986). Após a coleta, determinou-se a massa verde (MV) por vaso e, após secagem em estufa a 60° C até peso constante, a massa seca (MS) por vaso.

Os dados obtidos para cada variável foram organizados de maneira a formar três grupos de tratamentos ou curvas de resposta às doses para cada herbicida. Uma curva foi formada pelas seis doses de metribuzin aplicado isoladamente, outra com as mesmas seis doses associadas com 40  $\mu\text{M}$  de clomazone e a terceira com as seis doses associadas com 80  $\mu\text{M}$  de clomazone. Para o clomazone, uma curva com seis doses do produto isolado, outra com as seis doses em associação com 70 nM de metribuzin e a terceira com as seis doses em associação com 140 nM de metribuzin.

Cada grupo de tratamentos assim organizado sofreu análise da variância e após, regressão não linear, ajustando-se o modelo log-logístico expresso na equação 2.6 (Capítulo I) (Streibig & Kudsk, 1993; Seefeldt et al., 1995). Para tanto, valeu-se do aplicativo computacional SAS<sup>®</sup> (versão 8.1-TS1MO-UFRGS), que emprega em seu “proc nlin” (Apêndice 11.7) o algoritmo de Gauss-Newton (Motulsky & Ransnas, 1987; SAS, 1989). Com o ajuste deste modelo obteve-se para cada curva o valor  $I_{50}$ , em um total de seis parâmetros para cada variável. Estas doses de  $I_{50}$  foram representadas graficamente, formando um isobograma com metribuzin *versus* clomazone (Tames, 1964; Morse, 1978; Streibig & Kudsk, 1993; Gessner, 1995).

As doses  $I_{50}$  de cada herbicida aplicado isoladamente foram unidas, gerando a isobole de aditividade (Morse, 1978; Streibig & Kudsk, 1993; Gessner, 1995). Em torno da isobole de aditividade foram traçadas linhas unindo os intervalos de confiança (IC) (bilaterais) de 97,5, 95, 90 e 80% de cada um dos  $I_{50}$  de metribuzin e clomazone isolados, sendo denominadas de faixas de confiança (FC). A combinação das probabilidades dos dois intervalos é dada pelo produto das mesmas. A união dos intervalos de confiança de 97,5% de cada um dos  $I_{50}$  dos produtos isolados, por exemplo, gerou a FC de 95%. Da mesma forma, a faixa de 90% corresponde à união dos intervalos de 95%, a faixa de 81%, à união dos intervalos de 90% e a faixa de 64%, à união dos intervalos de 80% (Gessner, 1995).

Os quatro  $I_{50}$  resultantes das curvas com associação de metribuzin e clomazone foram representados por círculos cheios e barras verticais ou horizontais, representando seus intervalos de confiança de 95, 90 e 80%. A variável dano sofreu transformação  $\arcsen\sqrt{x + 0,5}$  para corrigir a

heterocedasticidade (Riboldi, 1995). Para cada curva ajustada, calculou-se a falta de ajuste segundo Seefeldt et al., (1995), pela expressão:

$$F_{aj.} = \{(SQ_{er.} - SQ_{res.}) / (GL_{er.} - GL_{res.})\} / (SQ_{er.} / GL_{er.}) \quad \text{Equação 4.1,}$$

onde  $SQ_{er.}$  é a soma de quadrados do erro da análise da variância,  $SQ_{res.}$  é a soma de quadrados do resíduo da regressão não linear,  $GL_{er.}$  são os graus de liberdade do erro da análise da variância e  $GL_{res.}$  os graus de liberdade do resíduo da regressão não linear.

Foi também calculado  $IC_{omb}$  (Ramakrishnan & Jusko, 2001) pela expressão:

$$IC_{omb} = I_{50ab1} / I_{50a} + I_{50ab2} / I_{50b} \quad \text{Equação 4.2,}$$

onde  $I_{50ab1}$  e  $I_{50ab2}$  são as doses  $I_{50}$  dos produtos em associação e  $I_{50a}$  e  $I_{50b}$ , as doses  $I_{50}$  dos produtos aplicados isolados.

#### 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de resposta da MV às doses de metribuzin aplicado isolado e em associação com 40 e 80  $\mu\text{M}$  de clomazone encontram-se na Figura 4.1. Os resultados obtidos nestas três combinações de tratamentos foram adequadamente ajustados ao modelo log-logístico, com teste de falta de ajuste não significativo (Apêndice 11.8). Os três  $I_{50}$  obtidos pelo ajuste do modelo, de 307,7 nM, 183,6 nM e 108,5 nM, respectivamente para metribuzin isolado, metribuzin + 40  $\mu\text{M}$  de clomazone e metribuzin + 80  $\mu\text{M}$  de clomazone,

demonstram a contribuição proporcionada pela associação das duas doses de clomazone às seis doses do metribuzin.

Da mesma forma, as curvas de resposta às doses de clomazone aplicado isolado e em associação com 70 e 140 nM de metribuzin (Figura 4.2) também foram bem ajustadas pelo modelo log-logístico (Apêndice 11.8). Os  $I_{50}$  obtidos pelo ajuste do modelo aos resultados, de 176,2  $\mu\text{M}$ , 116,3  $\mu\text{M}$  e 51,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente para clomazone isolado, clomazone + 70 nM de metribuzin e clomazone + 140 nM de metribuzin, também refletem a contribuição da associação das duas doses de metribuzin ao desempenho das seis doses de clomazone sobre o girassol.

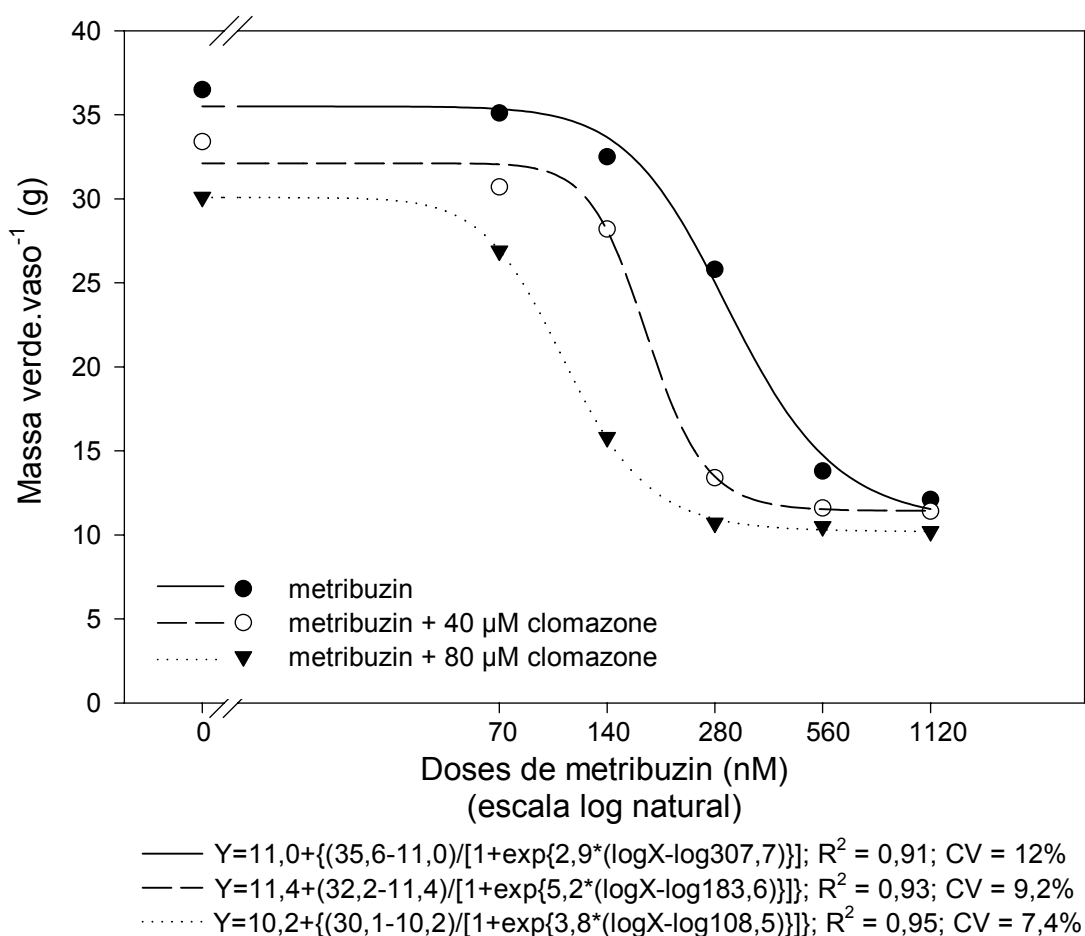


FIGURA 4.1. Curvas de resposta da massa verde de girassol às doses do herbicida metribuzin, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com clomazone. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

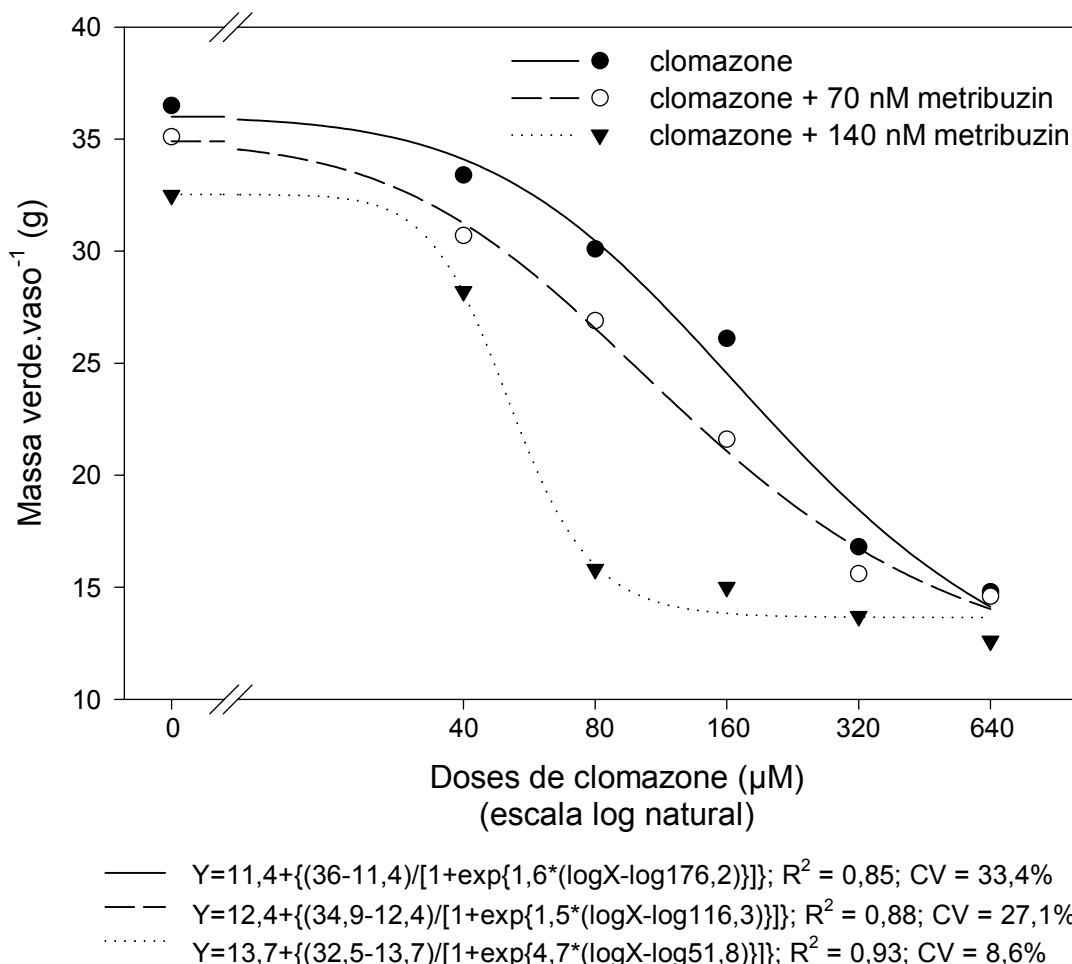


FIGURA 4.2. Curvas de resposta da massa verde de girassol às doses do herbicida clomazone, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com metribuzin. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Na comparação do desempenho dos dois herbicidas, fica evidente a maior capacidade do metribuzin em provocar redução da MV de girassol, uma vez que suas doses estão expressas em unidade mil vezes inferior à unidade de dose do clomazone. Embora, proporcionalmente, a redução que clomazone proporciona nos I<sub>50</sub> de metribuzin, na ordem de 40 e 65%, para 40 e 80 μM de clomazone, é

semelhante à redução que metribuzin proporciona nos  $I_{50}$  de clomazone, de 35 e 70%, para 70 e 140 nM de metribuzin.

Os coeficientes de determinação das seis curvas com valores superiores a 0,85 demonstram que grande parte da variação da MV foi explicada pelas doses dos herbicidas (Figuras 4.1 e 4.2). Já os desvios padrões relativos (CV) são razoáveis para a esta variável em experimentos desta natureza (Souza et al., 2000).

A variável MS (Figuras 4.3 e 4.4) refletiu o comportamento apresentado pela MV, com valores de  $I_{50}$  semelhantes, bem como no teste de falta de ajuste (Apêndice 11.8) e nos coeficientes de determinação e desvios padrões relativos (Figuras 4.3 e 4.4). Os  $I_{50}$  obtidos nas curvas de resposta às doses do metribuzin, de 333,9 nM, 184,5 nM e 105,6 nM, respectivamente para metribuzin isolado, associado a 40  $\mu$ M e 80  $\mu$ M de clomazone, demonstram a contribuição das duas doses de clomazone (40 e 80  $\mu$ M) na redução da MS de girassol em resposta aos tratamentos (Figura 4.3). Em comparação com os  $I_{50}$  obtidos com a variável MV, há equivalência entre os valores, demonstrando haver correlação entre estas duas variáveis.

Na curva de resposta às doses de clomazone, também se observou contribuição do metribuzin (70 e 140 nM) associado às doses de clomazone (Figura 4.4). A redução da MS em resposta às doses de clomazone foi acentuada quando houve a associação com metribuzin. Os valores de  $I_{50}$ , de 186  $\mu$ M, 106  $\mu$ M e 54,4  $\mu$ M, também foram bastante próximos aos obtidos para a variável MV. Avaliando-se em termos percentuais as reduções proporcionadas pelas associações mútuas, verifica-se que há equivalência entre elas, da mesma forma que foi observado na variável MV. Comparando-se os desvios padrões relativos

das curvas representadas nas Figuras 4.1 e 4.2 (variável MV) com os das curvas das Figuras 4.3 e 4.4 (variável MS) verifica-se menor variação na variável MS, o que, de certa forma, pode ser esperado, pela eliminação da variação que o teor de água pode causar sobre a determinação da MV.

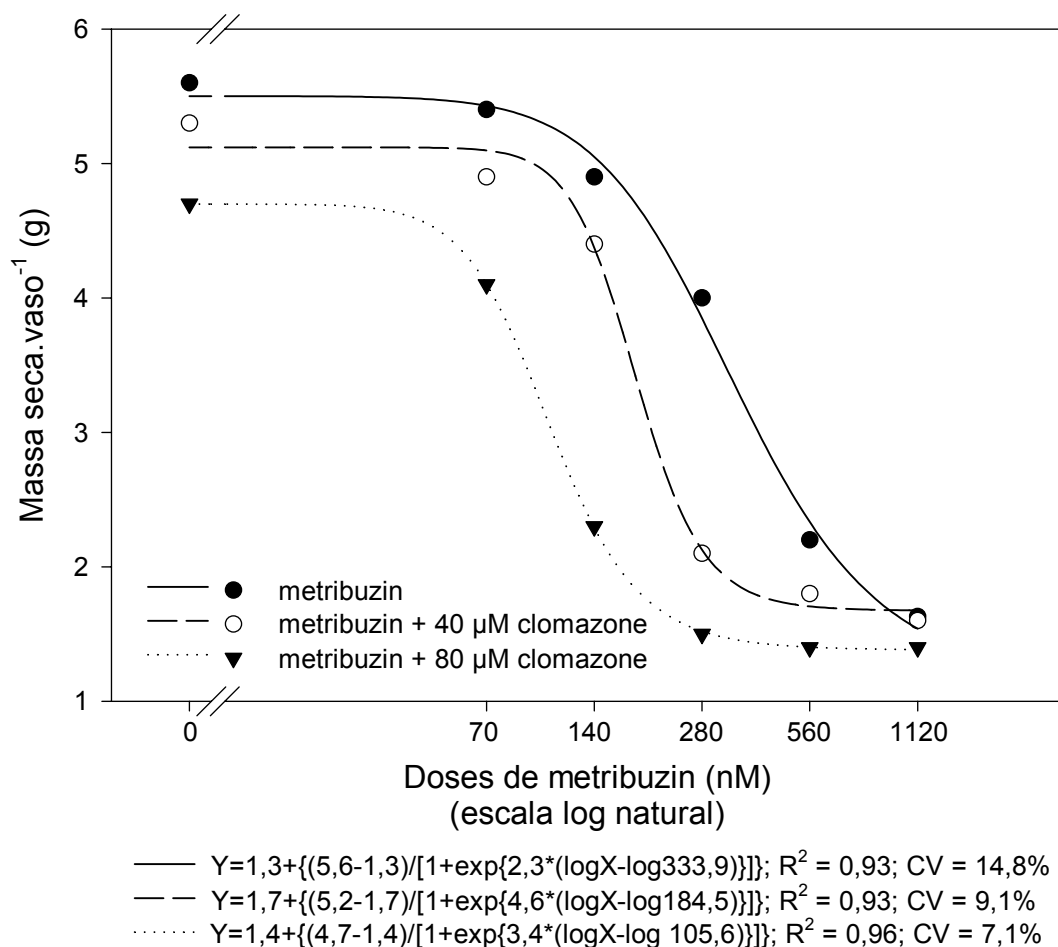


FIGURA 4.3. Curvas de resposta da massa seca de girassol às doses do herbicida metribuzin, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com clomazone. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Já a variável dano, obtida por avaliação visual, apresentou também curvas que ajustaram os valores atribuídos, com falta de ajuste não significativo e valores de I<sub>50</sub> também semelhantes aos obtidos nas outras variáveis (Figuras 4.5 e 4.6) (Apêndice 11.8). Embora os coeficientes de determinação tenham sido elevados, como nas demais variáveis, os desvios padrões relativos das curvas de

clomazone aplicado isoladamente e clomazone + 70 nM de metribuzin foram bastante elevados (Figura 4.5). Este resultado deve estar relacionado ao tipo de sintoma produzido pelo clomazone, em que o “branqueamento” provocado, pode dificultar a atribuição mais precisa de um percentual de dano (Devine et al., 1993b).

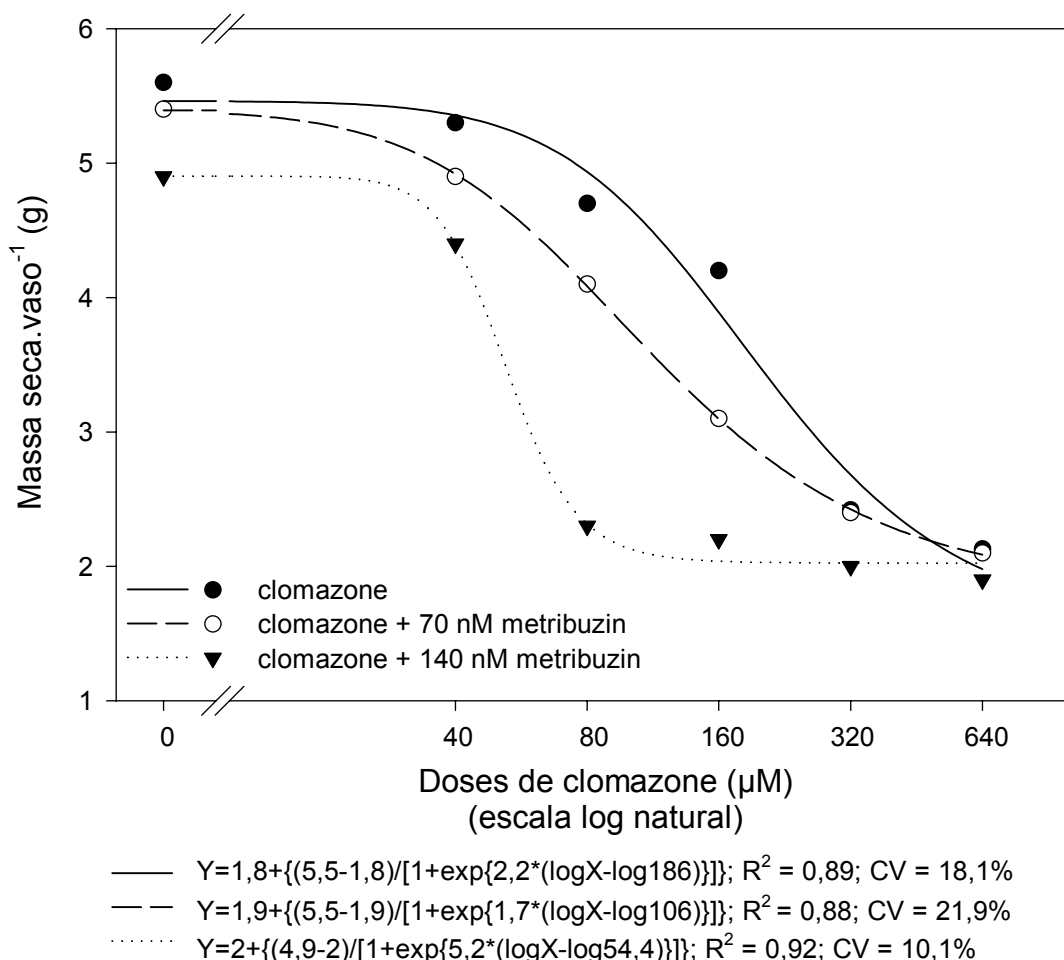


FIGURA 4.4. Curvas de resposta da massa seca de girassol às doses do herbicida clomazone, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com metribuzin. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Analisando-se em conjunto os resultados das curvas de resposta às doses ajustadas para as três variáveis, verifica-se que em todas elas a associação dos herbicidas sempre reduziu a dose necessária para provocar 50% do efeito avaliado. Em trabalho com associação de mecoprop-P e tribenuron-methyl sobre



*Veronica persica*, também foi observada a redução dos  $I_{50}$  para a variável MV, à medida que se aumentava a proporção de tribenuron-methyl na associação (Streibig et al., 1998).

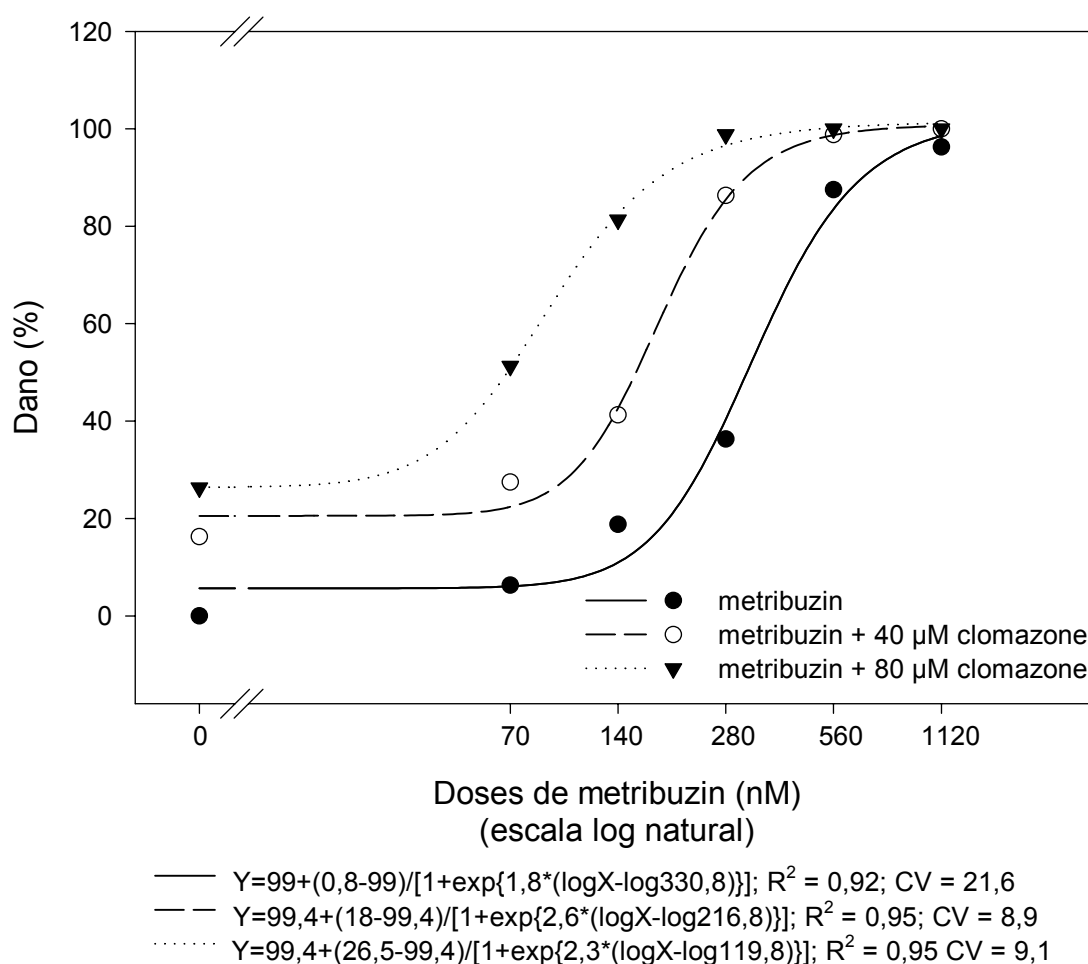


FIGURA 4.5. Curvas de resposta do dano em girassol em resposta às doses do herbicida metribuzin, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com clomazone. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

O isoblograma formado para a variável MV, com a isobole de aditividade, traçada entre os  $I_{50}$  de metribuzin e clomazone aplicados isolados, com as faixas e intervalos de confiança para os  $I_{50}$  obtidos estão na Figura 4.7. Por este isoblograma verifica-se que os  $I_{50}$  das quatro representações de associação entre os dois herbicidas estão abaixo da isobole de aditividade. Isto é, estão na região considerada como de interação sinérgica. Mas, considerando-se as FC

entre a isobole de aditividade e os IC dos  $I_{50}$  das associações, representados pelas barras verticais e horizontais, as associações de clomazone com metribuzin 140 nM é que apresentam maior probabilidade de sinergismo, situando-se entre as FC de 81 e 64%. Isto pode ser interpretado como entre 64 e 81% das vezes que estas associações forem aplicadas, a ação resultante será sinérgica. Vale dizer que a representação mencionada, reflete a  $I_{50}$  estimada pela curva de resposta às doses de clomazone (seis doses) em associação com 140 nM de metribuzin.

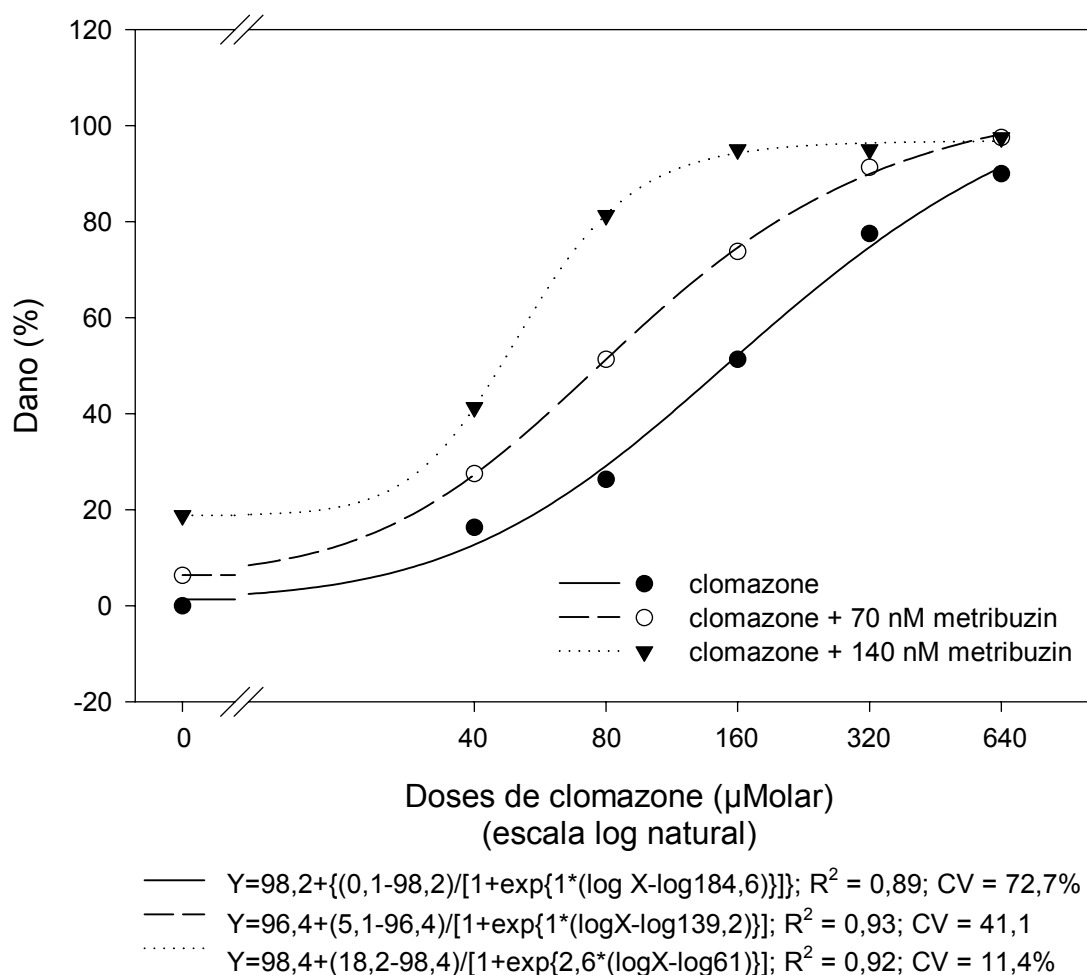


FIGURA 4.6. Curvas de resposta do dano em girassol em resposta às doses do herbicida clomazone, aplicado na solução nutritiva, isolado e em associação com metribuzin. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

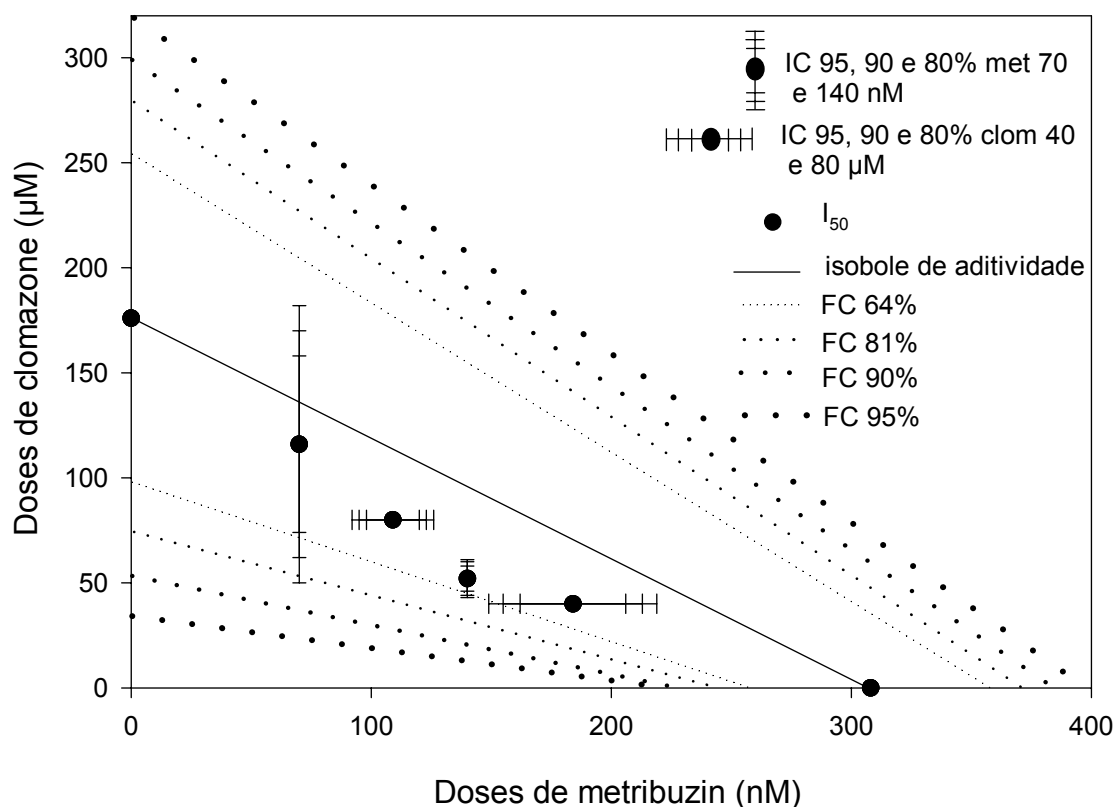


FIGURA 4.7. Isobolograma da variável massa verde de girassol com os valores da dose necessária para obter 50% de resposta ( $I_{50}$ ), obtidos de curvas de resposta às doses de metribuzin (met) e clomazone (clom), aplicados isolados e em associação, com as faixas de confiança (FC) e intervalos de confiança (IC) correspondentes. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Para as demais associações, as probabilidades de sinergismo são menores e mais variáveis (Figura 4.7), mas sempre posicionando-se entre a região de sinergismo e aditividade. As associações de metribuzin e clomazone 40  $\mu\text{M}$  e metribuzin e clomazone 80  $\mu\text{M}$  situam-se ao redor da FC de 64%, onde metribuzin e clomazone 40  $\mu\text{M}$ , mais variável em seu IC, vai desde a FC de 81% até além da 64%, na direção da isobole de aditividade. Metribuzin e clomazone 80  $\mu\text{M}$ , com IC menor, situa-se em torno da FC de 64%. Por fim, a representação das associações de clomazone e metribuzin 70 nM situa-se entre a FC de 64% e a

isobole de aditividade, mas com IC bastante amplo, variando desde a região entre 90% e 81% até além da isobole, o que a torna menos informativa.

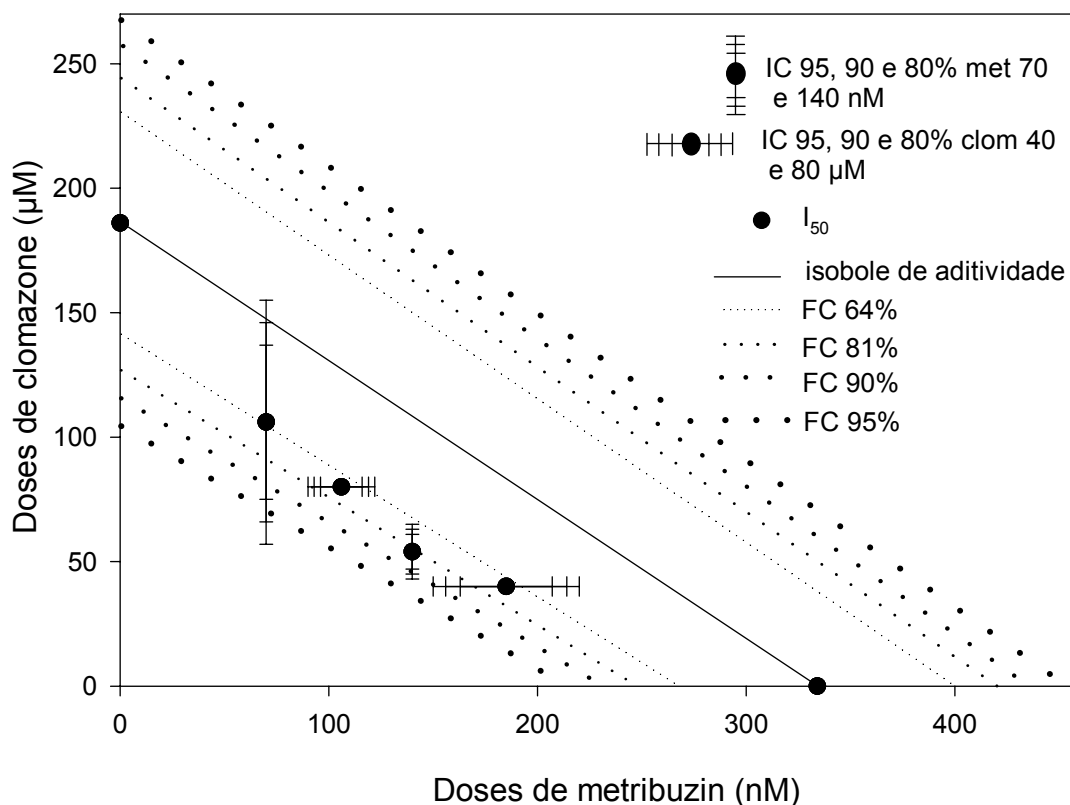


FIGURA 4.8. Isobolograma da variável massa seca de girassol com os valores da dose necessária para obter 50% de resposta ( $I_{50}$ ), obtidos de curvas de resposta às doses de metribuzin (met) e clomazone (clom), aplicados isolados e em associação, com as faixas de confiança (FC) e intervalos de confiança (IC) correspondentes. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

O isobolograma da variável MS indica uma região menos ampla em torno da isobole de aditividade, delimitada pela representação da FC (Figura 4.8). Isto reflete a menor variação com que foram estimados os  $I_{50}$  para as curvas de resposta às doses de metribuzin e clomazone isolados para a variável MS. Por outro lado, como os  $I_{50}$  estimados para as duas variáveis foram equivalentes, as representações das associações posicionam-se de forma semelhante frente à isobole de aditividade. Mas também com menor variação em cada representação

das associações nesta variável MS. A consequência é que aumenta a probabilidade de sinergismo, com a análise desta variável.

Novamente as associações de clomazone e metribuzin 140 nM é que se destacam, com uma probabilidade em torno de 0,90 (Figura 4.8). A variação expressa por seu IC permite prever-se que entre mais de 81% a 95% das vezes que estas associações forem aplicadas, haverá sinergismo. As associações de metribuzin e clomazone 80  $\mu$ M tem sua representação situada entre 81% e 90% e as de metribuzin e clomazone 40  $\mu$ M entre 64% e 95%. Como na variável anterior, a representação das associações de clomazone e metribuzin 70 nM é a menos informativa, situando-se sobre a FC de 81%, mas variando desde a isobole de aditividade até além da FC de 95%.

O isoblograma que representa os resultados da variável dano apresenta-se como o menos informativo (Figura 4.9). As representações das associações estão situadas mais próximas da isobole de aditividade, além das FC e IC apresentarem-se bem mais amplos. Provavelmente a maior variabilidade encontrada nesta determinação (desvio padrão relativo elevado) tenha gerado intervalos de confiança maiores em todos  $I_{50}$ , o que provocou FC e IC mais extensos, inclusive com valores negativos, o que prejudica a análise da interação pelos resultados desta variável (Figura 4.9). Tem sido referido que quando a curva de resposta às doses tem inclinação menos acentuada, torna-se mais difícil estimar um limite inferior confiável para a curva logística (Streibig et al., 1999). De fato, quando se observa as curvas da variável dano, suas inclinações são as mais suaves, em comparação às variáveis MV e MS.

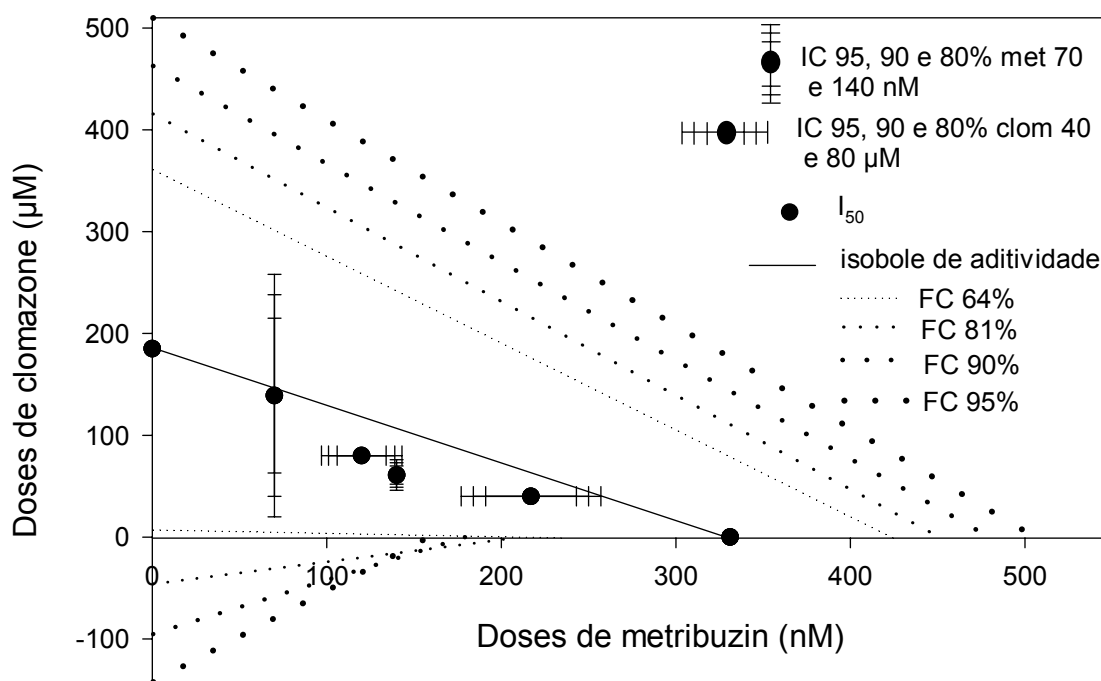


FIGURA 4.9. Isobolograma da variável dano em girassol com os valores da dose necessária para obter 50% de resposta ( $I_{50}$ ), obtidos de curvas de resposta às doses de metribuzin (met) e clomazone (clom), aplicados isolados e em associação, com as faixas de confiança (FC) e intervalos de confiança (IC) correspondentes. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Trabalhos que empregam a metodologia acima utilizada são disponíveis na área da farmacologia, onde são verificadas interações de aditividade, de supra-aditividade e infra-aditividade, correspondentes a sinergismo e antagonismo, respectivamente. Nestes trabalhos tem sido empregada com freqüência análises como a que foi aqui realizada, em que a posição relativa da representação das associações com a isobole de aditividade, é tomada como indicativo da interação que está ocorrendo (Carter Jr., 1995; Gessner, 1995; Ramakrishnan & Jusko, 2001). Em trabalho com benzoquinonas tóxicas, como sorgoleone, de origem natural e sintética, os autores empregaram metodologia similar, tentando demonstrar o mecanismo de ação do sorgoleone, como inibidor do FS II, pela

comprovação de ausência de interação quando em associação com bentazon, herbicida inibidor do FS II (Streibig et al., 1999).

Outra forma referida de analisar-se a interação de agentes químicos é através do princípio de aditividade de Loewe, expresso pelo  $IC_{omb}$  e calculado de acordo com a Equação 4.2 (Ramakrishnan & Jusko, 2001). Por este princípio,  $IC_{omb}$  igual a um representa aditividade, superior a um representa antagonismo e inferior a um, sinergismo. Na Tabela 4.1 estão os  $IC_{omb}$  para os quatro  $I_{50}$  resultantes das associações testadas. Nas três variáveis determinadas e em todas associações o índice calculado foi sempre inferior a um, indicando sinergismo na associação de metribuzin e clomazone por este método.

TABELA 4.1. Índice de combinação ( $IC_{omb}$ ) das associações de metribuzin e clomazone, calculados a partir das doses necessárias para obter 50% de reposta ( $I_{50}$ ), obtidas a partir das curvas de resposta às doses destes herbicidas. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Associações	$IC_{omb}^*$		
	MV <sup>1</sup>	MS <sup>1</sup>	Dano
Metribuzin + 40 $\mu$ M clomazone	0,82	0,77	0,87
Metribuzin + 80 $\mu$ M clomazone	0,81	0,75	0,80
Clomazone + 70 nM metribuzin	0,89	0,78	0,97
Clomazone + 140 nM metribuzin	0,75	0,72	0,75

\*  $IC_{omb} = I_{50ab1}/I_{50a} + I_{50ab2}/I_{50b}$  onde  $I_{50ab1}$  e  $I_{50ab2}$  são as doses  $I_{50}$  dos produtos em associação e  $I_{50a}$  e  $I_{50b}$ , as doses  $I_{50}$  dos produtos aplicados isolados.

<sup>1</sup>MV = massa verde; MS = massa seca.

Apesar dos isobogramas não mostrarem a existência de sinergismo em todas associações com alto nível de probabilidade, em nenhum momento há indicativo de antagonismo, o que não pode ser descartado *a priori*, quando do estudo de qualquer tipo de associação (Green, 1989). Por outro lado, existem elementos que apontam para a existência de sinergismo, embora algumas associações, principalmente nas variáveis MV e dano, não se distinguem da aditividade. De qualquer forma, fica saliente a necessidade de desenvolver-se

mais aprimoradamente a metodologia de comparação entre os resultados da associação e a linha de aditividade teórica traçada entre os  $I_{50}$  dos produtos isolados. Além disso, o maior domínio dos fatores que provocam variabilidade experimental, certamente contribui para a melhor comprovação do tipo de interação presente.

#### **4.5. CONCLUSÕES**

A variável MS permitiu estabelecer, em algumas associações, a existência de sinergismo na associação dos herbicidas metribuzin e clomazone.

Pelo princípio de aditividade de Loewe, a associação de metribuzin e clomazone é sinérgica em todas associações testadas.



## **5. CAPÍTULO IV - IMPACTO DA ASSOCIAÇÃO DE METRIBUZIN E CLOMAZONE SOBRE AS RELAÇÕES DE INTERAÇÃO DE SOJA (*Glycine max*) E GIRASSOL (*Helianthus annuus*)**

### **5.1. RESUMO**

A análise da associação de metribuzin e clomazone ao nível de comunidade pode valer-se de delineamento específico para estudo da interferência intra e interespecífica, como o delineamento dialélico. Foi conduzido um experimento em estufa plástica com o objetivo de analisar o impacto da associação dos herbicidas metribuzin e clomazone sobre as relações de interferência entre soja e girassol, este como modelo de planta daninha. Empregou-se o delineamento dialélico com cinco arranjos de plantas por vaso, representados por soja uma planta, soja duas plantas, girassol uma planta, girassol duas plantas e soja e girassol, constituindo o primeiro fator, que foi combinado com tratamentos herbicidas formados por doses de 0 e 115 g.ha<sup>-1</sup> de metribuzin, 0 e 200 g.ha<sup>-1</sup> de clomazone, aplicados isolados e a associação de metribuzin e clomazone nas mesmas doses, todos aplicados em pré-emergência, constituindo o segundo fator, totalizando 24 tratamentos. Os arranjos de soja duas plantas e girassol duas plantas foram considerados pela média das duas plantas. O arranjo soja e girassol manteve as determinações individualizadas por planta. Determinou-se a massa verde e massa seca das plantas de soja e girassol 30 dias após a emergência. Os resultados demonstram que a soja reduziu sua

massa verde em arranjo consigo mesma e em combinação com girassol. O girassol reduziu sua massa verde e massa seca em arranjo consigo mesmo e com soja. O arranjo de soja e girassol no mesmo vaso reduziu a tolerância da soja à associação de metribuzin e clomazone na massa verde e à associação e ao metribuzin isolado na massa seca. Não foi possível comprovar o sinergismo da associação de metribuzin e clomazone pela relação de interferência entre soja e girassol.

## 5.2. INTRODUÇÃO

A presença de plantas daninhas no mesmo ambiente das culturas dá origem a várias interações que se estabelecem nestas comunidades. Estas interações são denominadas de interferência e representam o efeito que a presença de uma planta tem sobre o crescimento ou desenvolvimento da outra. Entre as várias interações possíveis, aquelas que causam efeito negativo, como a competição, são as mais importantes de serem investigadas, do ponto de vista do controle de plantas daninhas. A competição é definida como o efeito adverso exercido entre plantas que compartilham recursos essenciais escassos no meio (Radosevich et. al., 1997).

A interferência resultante da convivência de ervas com as culturas pode ser estudada por diversas abordagens. A mais simples de todas envolve o uso de experimentos aditivos, em que a densidade da cultura é mantida constante e a densidade da planta daninha é variável, de acordo com sua ocorrência natural na área. Como a densidade da planta daninha varia entre os tratamentos, a proporção entre as espécies se modifica de acordo com a densidade total. Além disso, a cultura tem espaçamento constante, mas as plantas daninhas ocorrem

aleatoriamente, dificultando a separação entre a competição intra-específica e a interespecífica. Por estas limitações, tem sido propostos outros métodos mais elucidativos (Radosevich et. al., 1997).

Para superar as limitações dos experimentos aditivos, tem sido propostos três principais métodos para estudar interação: os experimentos substitutivos, os sistemáticos e de vizinhança. Os experimentos substitutivos dividem-se em séries de substituição, delineamento de Nelder e delineamento dialélico (Radosevich et al., 1997).

Todos experimentos substitutivos pressupõem que os rendimentos de populações mixtas podem ser comparados com os rendimentos de uma única espécie. Desta forma, o método da séries de substituição envolve a comparação entre uma monocultura com diferentes proporções entre as duas espécies em questão, mantendo-se a densidade total sempre constante. Assim, é possível distinguir-se entre os efeitos devido às diferentes proporções entre as espécies e aqueles devido à densidade total existente. Entre as limitações deste método estão a impossibilidade de examinar-se os efeitos totais resultantes da interferência, apesar de ser possível determinar os efeitos relativos à competição intra e interespecífica. Outro aspecto diz respeito aos rendimentos esperados da monocultura e os efetivamente encontrados, já que as diferentes densidades produzirão diferentes rendimentos. Por fim, o método tem sido considerado artificial para as condições de campo, já que dificilmente encontra-se naturalmente densidades fixas como aquelas que o método utiliza (Radosevich et. al., 1997).

Já o delineamento de Nelder aplica-se mais a estudos de competição intra-específica, onde plantas são cultivadas na forma de um arco ou círculo, com a

área disponível para cada planta variando de forma constante. Este tipo de abordagem é mais indicado para definir-se a melhor densidade para uma determinada cultura. Mas é impróprio para o estudo de interação entre duas espécies (Radosevich et. al., 1997).

O delineamento dialélico utiliza apenas um ou dois indivíduos de cada espécie por tratamento. Num estudo com duas espécies, são estudados três arranjos diferentes. No primeiro arranjo, um indivíduo de cada espécie é cultivado isoladamente. No segundo arranjo, dois indivíduos da mesma espécie são cultivados em combinação. No terceiro arranjo, dois indivíduos, um de cada espécie, são cultivados em associação. Desta maneira, é possível estudar-se tanto a interação intra-específica como a interação interespecífica. Sua grande vantagem é a simplicidade do delineamento, permitindo a coleta de dados ao longo do ensaio até de variáveis que necessitam a destruição do material. Este método é derivado de análises genéticas e tem sido usado extensivamente por pesquisadores da área de melhoramento e todos aqueles que necessitam investigar as interações intra e interespecíficas (Radosevich et. al., 1997; Gibson et al., 1999).

A análise da associação dos herbicidas metribuzin e clomazone como modelo para estudar o sinergismo entre herbicidas inibidores do fluxo de elétrons do fotossistema II e da síntese de carotenóides deve, certamente, incluir o estudo ao nível de comunidade. Para melhor investigar o impacto desta associação de herbicidas sobre as relações de interferência entre uma cultura, a soja e uma espécie tomada como modelo para uma planta daninha, o girassol, é que executou-se o presente trabalho. Para tanto, foi definido o emprego do delineamento dialélico como base para o estudo da associação de metribuzin e

clomazone, tendo por objetivo analisar o impacto desta associação sobre as relações de interferência entre a soja e o girassol.

### 5.3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido durante o mês de dezembro e contou com a combinação de cinco arranjos de plantas e quatro tratamentos herbicidas. Os arranjos foram representados por uma planta de soja por vaso, duas plantas de soja por vaso, uma planta de girassol por vaso, duas plantas de girassol por vaso e uma planta de soja mais uma planta de girassol por vaso, de acordo com o delineamento dialélico (Radosevich et al., 1997; Gibson, 1999). Sobre estes arranjos aplicou-se, após a semeadura, metribuzin (Apêndice 11.1.2), nas doses de 0 e 115 g.ha<sup>-1</sup>, clomazone (Apêndice 11.1.2), nas doses de 0 e 200 g.ha<sup>-1</sup>, e a associação de ambos, nas mesmas doses. O delineamento experimental foi completamente casualizado, com quatro repetições.

As plantas de soja, cultivar BRS 66 e de girassol, híbrido DKB 11, foram cultivadas em vasos de polietileno tereftalato (PET), com 10 cm de diâmetro, 17 cm de altura e 1200 cm<sup>3</sup> de capacidade volumétrica. Foi utilizado como substrato 900 g.vaso<sup>-1</sup> de solo peneirado, cuja análise físico-química indicou 290 g.kg<sup>-1</sup> de argila, 19 g.kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica, 25 mg.dm<sup>-3</sup> de P, 123 mg.dm<sup>-3</sup> de K e pH (H<sub>2</sub>O:solo 1:1) de 6,0. As plantas foram mantidas em ambiente protegido (estufa plástica), com temperatura máxima média de 32°C, mínima média de 20°C, fotoperíodo médio de luz natural de 13 horas e fluxo fotônico fotossintético máximo de 950 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> ao meio dia. As plantas foram irrigadas sempre que necessário, a fim de manter-se o solo com umidade em torno de 80% de sua capacidade de campo.

A aplicação dos tratamentos herbicidas foi realizada com pulverizador costal pressurizado a  $\text{CO}_2$ , utilizando-se barra com quatro bicos de jato plano tipo "leque" 8002 XR, espaçados 50 cm e consumo de calda equivalente a  $200 \text{ L ha}^{-1}$ . A temperatura do ar no momento da aplicação era de  $28^\circ\text{C}$  e a umidade relativa de 60%. O solo encontrava-se com umidade em torno de 80% da sua capacidade de campo.

Decorridos 30 dias após a emergência, coletou-se as plantas de cada vaso (parte aérea e raízes) e determinou-se a massa verde (MV) de cada planta. Após secagem em estufa a  $60^\circ \text{C}$  até peso constante, determinou-se a biomassa seca (MS). Para os vasos com duas plantas de soja e duas plantas de girassol, considerou-se a média das duas plantas, mantendo-se valores individualizados nos arranjos de soja e girassol no mesmo vaso.

As duas variáveis determinadas, organizadas em esquema fatorial  $6 \times 4$  (soja uma planta, soja duas plantas, girassol uma planta, girassol duas plantas, soja + girassol - soja e soja + girassol - girassol; sem herbicida, metribuzin  $115 \text{ g.ha}^{-1}$ , clomazone  $200 \text{ g.ha}^{-1}$  e metribuzin + clomazone nas mesmas doses isoladas), sofreram análise da variância e suas médias foram comparadas pelo teste Duncan, ao nível de significância de 5%.

#### **5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise da variância aplicada aos resultados das variáveis MV e MS demonstrou haver interação do arranjo de plantas com os tratamentos herbicidas (Apêndice 11.9). Por isso, não serão considerados isoladamente os efeitos principais de cada fator, mas sim, o comportamento dos arranjos de plantas

dentro de cada tratamento herbicida e os tratamentos herbicidas dentro de cada arranjo de planta.

A análise dos resultados obtidos com o tratamento sem herbicida permite avaliar as interações da soja e girassol intra e interespecificamente (Tabelas 5.1 e 5.2). Verifica-se, pela variável MV, que soja e girassol cultivados isoladamente tiveram maior desenvolvimento do que quando combinados consigo mesmo e com a outra espécie (Tabela 5.1). Por este resultado, a interferência exercida pelo girassol sobre a soja foi a mesma que a soja exerceu sobre ela própria, reduzindo sua MV quando duas plantas ocupavam o mesmo vaso. Da mesma forma ocorreu com o girassol, em que a interferência exercida pela soja sobre o girassol foi a mesma que o girassol exerceu sobre ele próprio.

TABELA 5.1. Massa verde de soja e girassol, em resposta a diferentes arranjos de plantas e à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone, isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Tratamentos	Sem herbicida	Metribuzin 115 g.ha <sup>-1</sup>	Clomazone 200 g.ha <sup>-1</sup>	Metribuzin + clomazone <sup>1</sup>
	g.planta <sup>-1</sup>			
Soja - 1 planta	A 6,88 a <sup>2</sup>	A 6,32 a	A 7,78 a	A 5,82 a
Soja - 2 plantas	A 3,87 b	A 3,95 b	A 4,02 b	A 3,56 b
Girassol - 1 planta	A 6,60 a	BC 1,05 c	B 2,88 bc	C 0,00 c
Girassol - 2 plantas	A 3,85 b	BC 0,13 c	B 1,94 c	C 0,00 c
Soja + girassol - soja	A 3,69 b	AB 2,10 c	AB 2,49 bc	B 1,55 c
Soja + girassol - girassol	A 4,37 b	B 1,05 c	A 3,42 bc	B 1,43 c
CV (%) <sup>3</sup>	39,6			

<sup>1</sup>Metribuzin 115 g.ha<sup>-1</sup> + clomazone 200 g.ha<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup>Médias antecedidas de mesma letra maiúscula na linha e seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste Duncan ao nível de significância de 5%.

<sup>3</sup>Coefficiente de variação.

Na variável MS a soja não apresentou diferença entre a condição isolada e em combinação, seja consigo mesma ou com girassol (Tabela 5.2). O girassol teve maior MS isolado do que quando combinado consigo mesmo, mas não reduziu sua MS quando em combinação com a soja. Nesta variável, os resultados indicam que a soja sofreu interferência do girassol equivalente à interferência

intra-específica. Já o girassol teve a interferência intra-específica maior que a interespecífica provocada pela soja.

TABELA 5.2. Massa seca de soja e girassol, em resposta a diferentes arranjos de plantas e à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone, isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Tratamentos	Sem herbicida	Metribuzin 115 g.ha <sup>-1</sup>	Clomazone 200 g.ha <sup>-1</sup>	Metribuzin + clomazone <sup>1</sup>
	g.planta <sup>-1</sup>			
Soja - 1 planta	A 1,80 ab <sup>2</sup>	A 1,62 a	A 1,98 a	A 2,12 a
Soja - 2 plantas	A 1,20 b	A 1,54 a	A 1,86 a	A 1,68 a
Girassol - 1 planta	A 2,30 a	BC 0,68 b	B 1,35 ab	C 0,00 b
Girassol - 2 plantas	A 1,43 b	B 0,02 b	A 0,84 b	B 0,00 b
Soja + girassol - soja	A 1,56 ab	B 0,66 b	AB 0,83 b	B 0,49 b
Soja + girassol - girassol	A 1,54 ab	B 0,44 b	AB 0,93 b	B 0,72 b
CV (%) <sup>3</sup>	35,4			

<sup>1</sup>Metribuzin 115 g.ha<sup>-1</sup> + clomazone 200 g.ha<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup>Médias antecedidas de mesma letra maiúscula na linha e seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste Duncan ao nível de significância de 5%.

<sup>3</sup>Coeficiente de variação.

Embora não totalmente coincidentes, os resultados exibidos pelas duas variáveis demonstram, de forma geral, que tanto a soja como o girassol tendem a reduzir seu desenvolvimento quando duas plantas estão presentes no mesmo vaso. Também que a interferência interespecífica equivale-se à interferência intra-específica no caso da soja e é maior a intra-específica no caso do girassol.

Ao analisar-se o impacto dos tratamentos herbicidas sobre as relações de interferência entre soja e girassol, observa-se que, no tratamento com metribuzin, a soja, em seu arranjo isolado, manteve o mesmo desenvolvimento (Tabela 5.1). Quando em combinação consigo mesma, reduziu sua MV de forma semelhante à verificada nos arranjos sem herbicida. No arranjo com girassol é que houve redução maior do que a verificada no tratamento sem herbicida. É possível que a presença do herbicida tenha provocado algum dano na soja, fragilizando sua capacidade competitiva frente ao girassol. O próprio girassol sofreu a ação do metribuzin, apresentando igual desenvolvimento tanto no arranjo isolado quanto



no arranjo em combinação consigo mesmo e com soja (Tabela 5.1). Estes resultados, apesar de estatisticamente semelhantes, numericamente apresentam magnitudes que vão de 0,13 g a 2,10 g. É possível que não tenha sido possível detectar significância entre estes resultados pelo coeficiente de variação elevado apresentado no experimento (Apêndice 11.9). Esperava-se que o tratamento com metribuzin isolado provocasse algum impacto no girassol, mas de expressão bem menos intensa do que a verificada, a fim de poder-se demonstrar o possível sinergismo da associação com clomazone. É possível também que o período de 30 dias entre a emergência das plantas e a coleta tenha sido demasiado longo, tornando o efeito herbicida mais pronunciado. Por outro lado, períodos menores poderiam não evidenciar os efeitos da interferência das espécies.

Na variável MS o comportamento foi semelhante, embora a soja não tenha reduzido seu desenvolvimento no arranjo de duas plantas de soja (Tabela 5.2). Os demais arranjos foram equivalentes entre si, demonstrando efeito pronunciado tanto sobre o girassol, como sobre a soja. Este efeito sobre a soja não era esperado, uma vez que o metribuzin apresenta seletividade à cultura (Ahrens, 1994). É possível que o baixo teor de matéria orgânica do solo utilizado como substrato tenha reduzido a seletividade do metribuzin à soja, provocando o dano indesejada (Reunião..., 2001). Além disso, a condição de cultivo em vasos de pequena capacidade podem ter contribuído para colocar as raízes de soja em contato com maiores quantidades de herbicida do que ocorreria em condições de campo.

No tratamento com clomazone, a soja manteve o comportamento exibido no tratamento sem herbicida, para a variável MV (Tabela 5.1). Na variável MS, não houve diferença entre o arranjo isolado e o arranjo de soja combinada

consigo mesma, o que também havia sido constatado no tratamento sem herbicida. Mas o arranjo de soja com girassol foi inferior aos arranjos de soja isolada e combinada consigo mesma, o que não havia ocorrido no tratamento sem herbicida. Novamente verifica-se que houve dano não esperado sobre a soja, provocada pelo clomazone, que é seletivo à cultura. A capacidade volumétrica do vaso, anteriormente referida, pode aqui também ter contribuído para reduzir a seletividade do clomazone à soja.

Da mesma forma que o período de duração do experimento, a capacidade volumétrica dos vasos pode ter influenciado negativamente os resultados. Mas, a exemplo do período de duração, uma maior capacidade volumétrica poderia não evidenciar os efeitos da competição entre as espécies.

O tratamento herbicida com a associação de metribuzin e clomazone apresentou, na variável MV, o mesmo resultado dos tratamentos anteriores (Tabela 5.1). O arranjo de soja isolada foi superior ao arranjo de soja em combinação consigo mesma e ao arranjo em combinação com girassol. Como no tratamento com metribuzin, o arranjo de soja em combinação com girassol foi inferior ao arranjo de soja combinada consigo mesma. Na variável MS, o comportamento da soja também foi equivalente ao verificado no tratamento com metribuzin. Já o girassol teve seu desenvolvimento reduzido a zero no tratamento com a associação dos herbicidas. Esperava-se que isto ocorresse, já que o girassol apresenta sensibilidade aos dois produtos, e a ação sinérgica pudesse se manifestar.

Pelas razões prováveis já expostas, o efeito de metribuzin isolado, mais intenso do que o esperado, prejudicou a exibição de sinergismo na associação. Também não se esperava que houvesse dano dos tratamentos sobre a soja. Pelo

contrário, o dano mais pronunciado da associação sobre o girassol, deveria refletir-se em maior desenvolvimento da soja nos arranjos em que a soja esteve combinada com girassol. A comparação dos vários tratamentos herbicidas dentro de cada arranjo de planta permite analisar melhor o que aconteceu. Em ambas variáveis (MV e MS), os arranjos de soja isolada e em combinação consigo mesma mantiveram-se constantes em todos tratamentos herbicidas (Tabelas 5.1 e 5.2). Por estes resultados, não se visualiza dano de nenhum tratamento herbicida sobre a soja. No arranjo de soja combinada com girassol é que se observa menor desenvolvimento da soja na associação metribuzin e clomazone, na variável MV (Tabela 5.1), e no tratamento com metribuzin isolado e na associação, na variável MS (Tabela 5.2).

Percebe-se, por estes resultados, que quando a soja esteve combinada com girassol, sua tolerância aos herbicidas foi reduzida. A presença de girassol influenciou de alguma forma a tolerância da soja, principalmente ao metribuzin e a sua associação com clomazone. Estes resultados poderiam sugerir a existência de interação antagônica na associação destes produtos, já que houve redução da seletividade à cultura e menor dano sobre a planta alvo, o girassol. Mas, examinando-se a soja isolada e em associação consigo mesma, verifica-se que não houve interação.

Já o comportamento de cada arranjo de girassol frente aos tratamentos herbicidas demonstra que a associação de metribuzin e clomazone provocou dano mais acentuado, ou no mínimo igual, ao tratamento com metribuzin isolado (Tabelas 5.1. e 5.2). Quando em combinação com a soja é que este efeito foi menos intenso. Talvez a presença da soja no vaso tenha reduzido a

disponibilidade de herbicida para o girassol e com isso, provocado dano menos acentuado sobre o mesmo.

De qualquer forma, a existência de sinergismo na associação metribuzin e clomazone, não pode ser comprovada pela interação entre soja e girassol, servido de modelo para o estudo ao nível de comunidade. Provavelmente os fatores experimentais mencionados tenham contribuído para impedir tal comprovação.

### **5.5. CONCLUSÕES**

A existência de sinergismo na associação metribuzin e clomazone, não pode ser comprovada pela interação entre soja e girassol, não sendo possível empregá-la como modelo para o estudo de sinergismo ao nível de comunidade.

O efeito de interferência intra-específica no girassol cultivada em vasos isoladamente manifesta-se tanto na sua massa verde quanto na sua massa seca e reduz o desenvolvimento do girassol.

A soja cultivada em vasos sob interferência do girassol reduziu sua tolerância ao herbicida metribuzin e à associação metribuzin e clomazone.

A associação dos herbicidas metribuzin e clomazone não produziu dano mais pronunciado sobre o girassol do que a aplicação isolada de metribuzin.

A análise da interferência de girassol sobre soja não permitiu demonstrar a existência de sinergismo na associação entre metribuzin e clomazone.

## 6. CAPÍTULO V - ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS HERBICIDAS METRIBUZIN E CLOMAZONE PELO CONTROLE DE *Bidens pilosa* NA CULTURA DA SOJA

### 6.1. RESUMO

A investigação das interações decorrentes da associação de herbicidas tem seu nível mais abrangente quando avalia-se a associação ao nível de comunidade, constituída pela cultura e pela planta daninha. O objetivo deste trabalho foi verificar a existência de sinergismo na associação de metribuzin e clomazone no controle de *Bidens pilosa* infestando a cultura da soja. Para tanto, conduziu-se um experimento com esta cultura, em 1998/99. Os tratamentos foram representados por aplicação de metribuzin, nas doses de 0 e 280 g.ha<sup>-1</sup> e clomazone, nas doses de 0 e 560 g.ha<sup>-1</sup>, isolados e em associação, bem como tratamentos adicionais isolados de metribuzin 560 g.ha<sup>-1</sup>, clomazone 1.120 g.ha<sup>-1</sup> e testemunha capinada. Foram avaliadas aos 55 dias após a aplicação dos herbicidas (DAA), a porcentagem de cobertura e controle de *Bidens pilosa* (BIDPI), sua densidade aos 30 e 55 DAA, além de massa seca, área foliar e rendimento de grãos. Os resultados indicaram a ocorrência de sinergismo entre os herbicidas nos percentuais de cobertura e controle, sem valores conclusivos nas demais variáveis. Conclui-se que embora seja complexa a comprovação de sinergismo a campo, os resultados indicam a ocorrência de sinergismo na associação entre metribuzin e clomazone, nas doses testadas.

## 6.2. INTRODUÇÃO

A utilização simultânea ou seqüencial de dois ou mais herbicidas sobre uma mesma cultura, vem sendo cada vez mais empregada na agricultura e representa um avanço nas estratégias de controle às plantas daninhas. Despertam particular interesse as associações que apresentam sinergismo, pois permitem o uso de doses menores e controlam plantas daninhas resistentes (Gressel, 1990). Esse sinergismo muitas vezes ocorre quando associam-se dois herbicidas que apresentam diferentes mecanismos de ação, onde pode haver uma ação de complementaridade entre os mesmos, com um facilitando a ação física e ou bioquímica do outro (Matthews, 1994).

Os herbicidas inibidores do fotossistema II (FSII), como as triazinas, uréias e uracilas, exercem sua ação fitotóxica ligando-se ao nicho ou "bolso" da proteína  $D_1$ , onde a quinona  $B$  deveria ligar-se para receber os elétrons da quinona  $A$ . Isto bloqueia o transporte de elétrons no fotossistema e gera moléculas de clorofila mais carregadas energeticamente ( $^3Chl$ ). Nesse estado elas dão origem a uma reação em cadeia formando radicais livres ( $R^*$ ) como: oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), superóxidos ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^*$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que irão peroxidar os lipídios das membranas, formando novos radicais lipídicos, também capazes de oxidar outros lipídios de membranas, levando assim as plantas tratadas à morte (Fuerst & Norman, 1991; Gronwald, 1994; Vidal, 1997).

As plantas possuem mecanismos para evitar o estresse oxidativo produzido normalmente em pequeno grau durante a fotossíntese. Entretanto, quando as plantas são tratadas com inibidores do FSII, a quantidade de radicais produzida ultrapassa a capacidade de destoxificação desses mecanismos. Entre eles estão a ação dos carotenóides, presentes nas membranas dos tilacóides,

que protegem contra  $^1O_2$ ,  $^3Chl$  e peroxidação lipídica, dissipando o excesso de energia da clorofila na forma de calor, e a ação do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), que protege contra a peroxidação lipídica e do  $OH^*$ , ambos presentes nas membranas do tilacóide (Hall & Rao, 1980; Fuerst & Norman, 1991; Sandmann et al., 1991; Gronwald, 1994; Salisbury & Ross, 1994). No presente trabalho seguiu-se a hipótese que a associação de herbicidas do grupo dos inibidores do FS II com inibidores da síntese de carotenóides possa apresentar sinergismo. Os primeiros geram estresse oxidativo e os segundos inibem a capacidade da planta de combater esse estresse, tornando-a mais vulnerável e mais facilmente perecível.

A análise do desempenho de associações de herbicidas com vistas à comprovação de sinergismo deverá incluir a avaliação do controle de plantas daninhas em condições de campo. Estas ervas deverão ser de ocorrência em culturas para as quais os herbicidas em questão sejam registrados.

Nesta condição está *Bidens Pilosa* L., planta daninha de ocorrência em várias culturas, entre as quais a soja, cultura para a qual são registrados o metribuzin e clomazone, representantes dos inibidores do FS II e da síntese de carotenóides, respectivamente. Esta erva pertence à família Asteraceae (Compositae), a maior família dos vegetais superiores e que contém muitas das piores espécies de plantas daninhas, onde *B. pilosa* está entre as 76 piores espécies de plantas daninhas (Kissmann & Groth, 1993; Mitich, 1994).

*B. pilosa* é uma espécie anual nativa da América Tropical, considerada como planta daninha das mais prejudiciais. Seus aquênios adaptados à fácil aderência aos objetos garantem sua pronta disseminação. Ocorre principalmente em lavouras anuais de estação quente, mas também em pastagens, beiras de estradas e terrenos baldios (Kissmann & Groth, 1993; Mitich, 1994; Rocha, 1996).

*B. pilosa* apresenta crescimento rápido quando encontra temperaturas mais altas e umidade e em povoamento misto de dicotiledôneas compete muito bem, encontrando dificuldade na presença de gramíneas como *Digitaria* e *Brachiaria*. Apesar de ter algum valor positivo como planta medicinal, sua importância advém dos sérios problemas que causa nos cultivos que infesta, podendo causar decréscimos significativos em culturas anuais, em condições de altas infestações, figurando entre as dicotiledôneas de maior frequência na cultura da soja (Fleck & Candemil, 1995).

O nível de dano econômico de *B. pilosa* na cultura da soja, embora bastante variável de acordo com diversos fatores (ambiente, rendimento de grãos, preço dos grãos no mercado, custo do controle, época de semeadura e eficácia do herbicida) situa-se entre 0,3 a 33 plantas.m<sup>2</sup>, demonstrando o grande potencial daninho desta espécie sobre a soja (Rizzardi, 2002).

Experimentos realizados na cultura do girassol constataram que na presença de *B. pilosa* e outras espécies daninhas, a cultura do girassol respondeu de modo linear ao aumento da área que foi mantida livre de plantas daninhas durante seu ciclo de desenvolvimento (Fleck et al., 1986; Fleck et al., 1989).

Existem várias opções de controle químico para *B. pilosa*, entre elas metribuzin e clomazone figuram como apresentando controle acima de 80% (Reunião, 2001). Como os dois herbicidas em estudo apresentam controle satisfatório de *B. pilosa*, é de esperar-se que, com a associação dos produtos, no mínimo, se obtenham os percentuais de controle acima citados. Com isso, é provável que a associação permita o uso de doses menores, o combate ao surgimento de resistência, a ampliação do espectro de controle e todos benefícios decorrentes das associações de herbicidas.



Dentro da linha de abordagem de analisar-se a existência de sinergismo entre metribuzin e clomazone em vários níveis, pretendeu-se, com o presente trabalho, investigar esta associação ao nível de comunidade, através do controle de *B. pilosa* infestando a cultura da soja.

### 6.3. MATERIAL E MÉTODOS

Foi conduzido um experimento a campo, na safra agrícola de 1998-99, na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, localizada em Eldorado do Sul, RS, com a cultura da soja, em solo areno-argiloso, contendo 2,4% de matéria orgânica e pH 5,5. A cultura foi implantada em sistema de semeadura direta, em sucessão à aveia-preta e ervilhaca, dessecadas em 28/10/98 com glyphosate (Apêndice 11.1.2) a  $1.080 \text{ g.ha}^{-1}$ . A cultivar de soja BR 16 foi semeada em 18/11/98, com espaçamento de 45 cm entrelinhas e população final média de  $241.000 \text{ plantas.ha}^{-1}$ . A planta daninha predominantemente presente na área e alvo do trabalho foi *Bidens pilosa* (BIDPI), com população média de 217 a 317  $\text{plantas.m}^{-2}$  aos 30 e 55 dias após a semeadura da cultura, respectivamente.

Os tratamentos testados foram organizados em esquema bifatorial (quatro tratamentos), com delineamento de blocos casualizados e quatro repetições. As unidades experimentais mediram dois e meio por oito metros. O primeiro fator foi a aplicação de metribuzin (Apêndice 11.1.2) nas doses de 0 e  $280 \text{ g.ha}^{-1}$  e, o segundo fator, a aplicação de clomazone (Apêndice 11.1.2) nas doses de 0 e  $560 \text{ g.ha}^{-1}$ , com tratamentos adicionais de aplicação de metribuzin na dose de  $560 \text{ g.ha}^{-1}$ , clomazone na dose de  $1.120 \text{ g.ha}^{-1}$  e um tratamento capinado, totalizando sete tratamentos. A aplicação dos herbicidas foram feitas em pré-emergência das plantas cultivada e daninha. Os tratamentos representados por associação dos

herbicidas, tiveram os produtos aplicados na forma de mistura em tanque. Os demais tratamentos culturais exigidos para o desenvolvimento da cultura estiveram de acordo com as recomendações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (EPAGRI-CPPP, 1999).

A aplicação dos herbicidas ocorreu em 18-11-1998, com pulverizador costal pressurizado a CO<sub>2</sub>, utilizando-se barra com quatro bicos de jato plano tipo "leque" 8002 XR, espaçados 50 cm, com consumo de calda equivalente a 200 L.ha<sup>-1</sup>. A temperatura do ar era de 31° C e a umidade relativa de 53%. O tratamento capinado sofreu duas capinas, em 15/12/98 e em 05-01-1999.

A densidade de BIDPI foi avaliada aos 33 e 55 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), em área de 0,16 m<sup>2</sup> por parcela. Os percentuais de cobertura e controle de BIDPI foram obtidos por avaliação visual, considerando-se que 0% representa nenhuma cobertura e nenhum controle e 100%, cobertura total do terreno e controle de todas as plantas (Frans & Crowley, 1986). A massa seca de BIDPI por m<sup>2</sup> foi determinada a partir da coleta de todas as partes aéreas das plantas em área de 0,16 m<sup>2</sup>, aos 55 DAA, amostrada dentro da área tratada e fora da área útil para colheita da cultura. O material foi seco, até peso constante, em estufa a 60° C e pesado. A área foliar de BIDPI foi determinada a partir de cinco plantas coletadas ao acaso, em área contígua à da amostragem de massa seca, aos 55 DAA, medindo-se a área de todas as folhas, expressas por planta, através de medidor de área foliar LICOR. O rendimento de soja (GLXMA) foi obtido colhendo-se as duas linhas centrais da parcela, em 21-05-1999, numa área de 2,7 m<sup>2</sup>, corrigindo-se o peso para umidade de 13%, expresso em kg.ha<sup>-1</sup>.

As variáveis massa seca.m<sup>2</sup> e densidade de BIDPI sofreram transformação logarítmica, os percentuais de cobertura e controle, transformação  $\arcsen \sqrt{x+1}$ ,

todas para controlar a heterocedasticidade e, juntamente com a área foliar de BIDPI e rendimento de GLXMA, foram submetidas à análise da variância e comparação de médias pelo teste *t*, com nível de 5% de significância. Para avaliar a existência de sinergismo entre os herbicidas, todas variáveis acima foram submetidas à análise segundo o modelo proposto por Flint et al. (1988) (Capítulo I, Equação 2.4).

#### 6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de cobertura e de controle de BIDPI, avaliadas aos 55 DAA, revelam que a associação de metribuzin na dose de 280 g.ha<sup>-1</sup> e clomazone na dose de 560 g.ha<sup>-1</sup> produziu a menor cobertura vegetal do solo e proporcionou o melhor controle da planta daninha, igualado apenas por metribuzin na dose recomendada de 560 g.ha<sup>-1</sup> (Tabela 6.1). O efeito estimado da interação (Tabela 6.1) aponta para a existência de sinergismo da associação, com efeito estimado negativo e probabilidade inferior a 1%. Westberg et al. (1989) em trabalho com associação de clomazone (280 e 560 g.ha<sup>-1</sup>) e metribuzin (200 g.ha<sup>-1</sup>), encontraram sinergismo dos herbicidas no controle de *Ipomoea hederacea* var. *integriuscula* em um ano, mas não sendo evidente em outro ano. Em várias espécies estudadas com essa e outras associações, o sinergismo variou entre as espécies, doses e anos de cultivo.

As densidades de BIDPI apresentaram valores bastante variados (alto desvio padrão relativo), sendo que aos 30 DAA não houve diferença entre os tratamentos de herbicidas e o tratamento sem herbida (Tabela 6.1). Contudo, aos 55 DAA, apesar dos tratamentos herbicidas não terem diferido entre si, a associação igualou-se ao tratamento capinado, reduzindo significativamente a

densidade em relação ao tratamento sem herbicida. Além disso, observa-se que, enquanto houve aumento numérico da densidade entre 30 e 55 DAA no tratamento sem herbicida, em torno de 50%, na quase totalidade dos demais, a tendência numérica foi de redução.

O efeito estimado para a associação pelo tratamento estatístico proposto por Flint et al. (1988) não apontou significância, sendo os desvios de 0 (aditividade) observados, não significativos (Tabela 6.1). Vale ressaltar que as variáveis analisadas no presente trabalho apresentam comportamento oposto às variáveis analisadas no Capítulo I. Enquanto que aquelas variáveis aumentam com o tratamento herbicida, as variáveis estudadas aqui diminuem. Isto deve ser levado em conta ao considerar os desvios de 0 pela análise proposta por Flint et al. (1988). No presente caso, valores inferiores a 0 (negativos) representam sinergismo, e valores positivos, , representam antagonismo, ambos com significância estatística.

A massa seca acumulada de BIPDI reforça o comportamento observado nos percentuais de cobertura e controle, com a associação apresentando os menores valores, sendo acompanhada apenas pela maior dose de metribuzin, embora o efeito estimado da associação de herbicidas não tenha apresentado significância aceitável (Tabela 6.1).

A área foliar de BIPDI, avaliada aos 55 DAA, apresentou valores similares entre os tratamentos herbicidas, apresentando ausência de interação pela não significância do valor de  $t$  (Tabela 6.2).

TABELA 6.1. Cobertura do solo com *Bidens pilosa* (BIDPI) e controle aos 55 dias após a aplicação dos herbicidas (DAA), densidade de BIDPI aos 30 e 55 DAA, efeito estimado da associação e probabilidade de *t*. EEA UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 1998/99.

Tratamentos	Doses -g.ha <sup>-1</sup> -	Cobertura	Controle	Densidade de BIDPI	
		55 DAA	55 DAA	30 DAA	55 DAA
		-----%-----		-nº de plantas.m <sup>-2</sup> -	
Tratamento capinado	-	0 e <sup>1</sup>	100 a	0 b	0 c
Tratamento sem herbicida	-	78 a	0 e	217 a	317 a
Metribuzin	280	58 b	48 d	86 a	97 ab
Clomazone	560	53 b	48 d	72 a	61 ab
Metribuzin + clomazone	280+560	11 d	84 b	53 a	17 bc
Metribuzin	560	20 cd	78 bc	72 a	63 ab
Clomazone	1.120	24 c	69 c	144 a	116 ab
CV (%) <sup>2</sup>		18	16	39	55
Efeito estimado <sup>3</sup>		-0,58	-2,41	1,03	0,69
Valor de <i>t</i>		-4,09	-26,11	1,05	0,55
<i>t</i> <sub>calc.</sub> > <i>t</i> <sub>tab.</sub> <sup>4</sup>		0,003	0,0001	0,32	0,59

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente pelo teste *t* ao nível de 5% de significância.

<sup>2</sup>CV = desvio padrão relativo.

<sup>3</sup>Efeito estimado negativo e probabilidade de *t* inferior a 0,05 indicam sinergismo e efeito estimado positivo e probabilidade de *t* inferior a 0,05 indicam antagonismo.

<sup>4</sup>Nível mínimo de significância = probabilidade das diferenças observadas serem devido ao acaso.

É possível que a dissipação dos produtos no solo tenha afetado o desempenho da associação a longo prazo. Como metribuzin e clomazone são herbicidas aplicados em pré-emergência, a sua persistência diferencial no solo pode afetar a manifestação do sinergismo nas espécies estudadas. Gallaher & Mueller (1996) obtiveram 22 e 55 dias de meia-vida média para metribuzin e clomazone, respectivamente. Com isso, é possível imaginar-se que 22 dias após a aplicação dos tratamentos a absorção dos produtos por parte das ervas já era proporcionalmente diferente da inicial, fazendo com que o controle obtido aos 55 dias por exemplo, refletisse mais a ação do clomazone que da associação como um todo. A comparação das densidades de BIDPI aos 30 e 55 DAA nos diferentes tratamentos reforça esse ponto de vista (Tabela 6.1).

TABELA 6.2. Massa seca e área foliar.planta<sup>-1</sup> de *Bidens pilosa* (BIDPI), rendimento de soja (GLXMA), efeito estimado da associação e probabilidade de *t*. EEA UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 1998/99.

Tratamentos	Doses	Massa seca	Área foliar	Rendimento
		55 DAA	55 DAA	de grãos GLXMA
	--g.ha <sup>-1</sup> --	----g.m <sup>-2</sup> ----	-----cm <sup>2</sup> -----	-----kg.ha <sup>-1</sup> -----
Tratamento capinado	-	0,0 e <sup>1</sup>	0 c	680 a
Tratamento sem herbicida	-	87,9 a	265 a	442 bc
Metribuzin	280	56,4 ab	83 b	305 c
Clomazone	560	40,9 ab	53 bc	467 bc
Metribuzin + clomazone	280 + 560	8,8 d	34 bc	537 ab
Metribuzin	560	16,2 cd	75 b	433 bc
Clomazone	1.120	30,8 cb	65 bc	547 ab
CV (%) <sup>2</sup>		16	56	27
Efeito estimado <sup>3</sup>		-0,43	0,32	0,27
Valor de <i>t</i>		-1,62	2,25	1,47
<i>t</i> <sub>calc.</sub> > <i>t</i> <sub>tab.</sub> <sup>4</sup>		0,1386	0,051	0,176

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente pelo teste *t* ao nível de 5% de significância.

<sup>2</sup>CV = desvio padrão relativo.

<sup>3</sup>Efeito estimado negativo e probabilidade de *t* inferior a 0,05 indicam sinergismo e efeito estimado positivo e probabilidade de *t* inferior a 0,05 indicam antagonismo.

<sup>4</sup>Nível mínimo de significância = probabilidade das diferenças observadas serem devido ao acaso.

O rendimento de grãos da soja apresentou valores bastante baixos, possivelmente em função do estresse hídrico a que esteve submetida a cultura, principalmente nos estádios vegetativos e início do enchimento de grãos (Tabela 6.2). Apesar disso, a associação dos herbicidas e a aplicação isolada de clomazone na dose maior (1.120 g.ha<sup>-1</sup>) não diferiram do tratamento capinado, demonstrando ter proporcionado controle eficiente de BIDPI.

Durante todo o desenvolvimento da cultura não foram observados sintomas visuais de dano na mesma, sugerindo que os herbicidas testados e sua associação não potencializaram a ação tóxica dos produtos, nas doses estudadas. Salzman & Renner (1992), encontraram sinergismo na associação entre metribuzin e clomazone no dano sobre a soja. Combinações de metribuzin a 140 e 280 g.ha<sup>-1</sup> mais clomazone a 420 e 840 g.ha<sup>-1</sup> provocaram redução da massa seca dos ramos de soja, e foram consideradas sinérgicas pelo método de

Limpel (1964) e o teste DMS modificado desenvolvido por Hamill & Penner (1973). Embora indesejável do ponto de vista agrônomo, esses resultados reforçam a hipótese de sinergismo entre os herbicidas pertencentes aos dois mecanismos de ação.

## 6.5. CONCLUSÕES

A comprovação do sinergismo na associação de metribuzin e clomazone no controle de *Bidens pilosa* em convivência com a cultura da soja depende da variável analisada.

Há sinergismo na associação de metribuzin e clomazone no controle de *Bidens pilosa* em convivência com a cultura da soja, quando forem consideradas as variáveis cobertura do solo e controle de *Bidens pilosa*.

Tomando-se a associação de metribuzin e clomazone como modelo para o estudo de sinergismo entre herbicidas inibidores do fluxo de elétrons do fotossistema II e da síntese de carotenóides, conclui-se haver sinergismo entre estes mecanismos, nas condições verificadas neste trabalho.

## **7. CAPÍTULO VI - SELETIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE HERBICIDAS INIBIDORES DO FOTOSISTEMA II E DA SÍNTESE DE CAROTENÓIDES PARA AS CULTURAS DE SOJA E MILHO**

### **7.1. RESUMO**

Associações de herbicidas são mais vantajosas quando os componentes apresentam ação sinérgica no controle das plantas daninhas. Deve ser verificado, entretanto, se além do aumento de controle, não ocorre também redução na seletividade dos herbicidas envolvidos às culturas em que são aplicadas as associações. O objetivo desse trabalho foi o de verificar se a associação entre herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides, com potencial de sinergismo, mantém a seletividade encontrada nos produtos isolados. Foram conduzidos dois experimentos, sem infestações de plantas daninhas, com as culturas da soja e milho, na safra agrícola 1999/2000. No ensaio de soja, os tratamentos consistiram de metribuzin, nas doses de 0, 192 e 384 g.ha<sup>-1</sup>; clomazone, nas doses de 0, 400 e 800 g.ha<sup>-1</sup>; e tratamentos adicionais com a associação de 192 g.ha<sup>-1</sup> de metribuzin e 400 g.ha<sup>-1</sup> de clomazone e um tratamento capinado, totalizando sete tratamentos. No milho, os tratamentos consistiram de atrazine, nas doses de 0, 840 e 1.680 g.ha<sup>-1</sup>; isoxaflutole, nas doses de 0, 35 e 70 g.ha<sup>-1</sup>; e tratamentos com a associação de 840 g.ha<sup>-1</sup> de atrazine e 35 g.ha<sup>-1</sup> de isoxaflutole, todos em pré-emergência, e um tratamento capinado. Os resultados de rendimento das duas culturas não apresentaram



diferenças entre os tratamentos herbicidas e as testemunhas capinadas, demonstrando que a associação dos herbicidas em questão, nas doses empregadas, não prejudica a seletividade desses produtos às culturas em que são utilizados.

## 7.2. INTRODUÇÃO

O emprego de associações de herbicidas representa um avanço nas estratégias de controle às plantas daninhas e despertam particular interesse quando apresentam sinergismo, pois permitem o uso de doses menores e controlam plantas daninhas resistentes. O sinergismo, entretanto, pode não apenas aumentar o controle de infestantes, mas também aumentar o dano às culturas, limitando o emprego das associações de herbicidas. A associação de herbicidas desejável, portanto, é aquela que potencialize o controle da infestante, sem afetar a tolerância da cultura aos herbicidas utilizados (Gressel, 1990).

A seletividade dos herbicidas às culturas depende, basicamente, da capacidade das espécies tolerantes, culturas ou ervas, de metabolizar os herbicidas para formas não tóxicas. Também a absorção ou translocação diferencial, o local de ação insensível, ou ainda, a não ativação do herbicida para a forma tóxica, representam outros meios das plantas sobreviverem à ação herbicida (Devine et al., 1993b). Por exemplo, quando a seletividade do herbicida for devido à sua metabolização e a interação sinérgica entre dois ou mais herbicidas for devido, justamente, à inibição de sua metabolização, provavelmente haverá redução da tolerância da cultura aos herbicidas empregados na associação. Quando a seletividade depender dos outros meios citados,

provavelmente não haverá prejuízos à tolerância, mesmo com a existência de sinergismo (Simpson & Stoller, 1996).

Associações de herbicidas inibidores do fluxo de elétrons no fotossistema II (FS II) e inibidores da síntese de carotenóides (ISC) tem apresentado potencial de sinergismo no controle de girassol e picão-preto (Capítulos I ao IV). Para o uso adequado desta informação, há a necessidade de se avaliar a seletividade para algumas culturas.

Para muitos herbicidas são conhecidos os mecanismos de tolerância, enquanto que outros, ainda permanecem por serem esclarecidos. Para os inibidores do FS II, predomina a metabolização, como o conhecido processo de destoxificação do atrazine (Apêndice 11.1.2) pela cultura do milho, por conjugação com glutathione, ou ainda a N-desalquilação catalisada pelo citocromo P-450 e, também, pela reação com o hidroxamato DIMBOA (Apêndice 11.1.2), nas suas raízes (Gronwald, 1994). Já o metribuzin (Apêndice 11.1.2) apresenta metabolização por desaminação através de redução, com posterior conjugação com açúcares e/ou homoglutationa. O sinergismo verificado entre metribuzin e o ácido picolínico *tert*-butilamida (PABA), tem sido explicado pela inibição da metabolização do primeiro, pela ação do PABA sobre os níveis de ascorbato, o agente redutor da primeira reação de destoxificação (Devine et al., 1993a).

Os herbicidas inibidores da síntese de carotenóides tem mecanismos variados de seletividade. Enquanto os inibidores da enzima fitoeno desaturase (PDS), como o norflurazon (Apêndice 11.1.2), tem sua seletividade baseada na enzima insensível das plantas tolerantes, o clomazone (Apêndice 11.1.2) parece depender da incapacidade de ativação por parte das plantas tolerantes, ou local de ação insensível, restando ainda definição mais precisa (Norman et al., 1990;

Vencill et al., 1990; Liebl & Norman, 1991; Sandmann et al., 1991; Scott et al., 1994). O herbicida isoxaflutole (Apêndice 11.1.2) é também incluído nesse grupo de mecanismo de ação, embora sua ação seja indireta na síntese de carotenóides, pois inibe a enzima *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), responsável pela formação de plastoquinona, que atua como cofator da enzima PDS (Lee et al., 1997). A base de sua seletividade ainda não é completamente conhecida, atribuindo-se sua rápida metabolização pelo milho, às reações de hidrólise (Ahrens, 1994).

Realizou-se o presente trabalho visando investigar se o sinergismo potencial entre as associações dos herbicidas pertencentes aos mecanismos de ação citados, pode comprometer a seletividade exibida pelos mesmos sobre as culturas da soja e do milho.

### 7.3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos, a campo, na safra agrícola de 1999-2000, com as culturas de soja e milho, na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, localizada em Eldorado do Sul, RS. As culturas foram implantadas em sistema de semeadura direta, em sucessão à aveia-preta, dessecada sete dias antes da semeadura com glyphosate (Apêndice 11.1.2) a  $1.080\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$ , em solo areno-argiloso, contendo 2,4% de matéria orgânica e pH 5,5.

No experimento com soja, a cultivar FT-Abyara foi semeada em 29/12/99, com espaçamento de 45 cm entrelinhas e população final média de  $420.000\text{ plantas}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Os tratamentos testados foram organizados no delineamento de blocos casualizados e quatro repetições. As unidades experimentais mediram dois e meio por sete metros. Os tratamentos consistiram de metribuzin nas doses

de 0, 192 e 384 g.ha<sup>-1</sup>, clomazone nas doses de 0, 400 e 800 g.ha<sup>-1</sup>, com tratamentos adicionais da associação de metribuzin 192 g.ha<sup>-1</sup> com clomazone 400 g.ha<sup>-1</sup>, e um tratamento capinado, totalizando sete tratamentos. A aplicação dos herbicidas foi feita em pré-emergência das plantas cultivada e daninha, em 29-12-1999, com pulverizador costal pressurizado a CO<sub>2</sub>, utilizando-se barra com quatro bicos de jato plano tipo "leque" 8002 XR, espaçados 50 cm, com consumo de calda equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup>. Os tratamentos representados por associação dos herbicidas, tiveram os produtos aplicados na forma de mistura em tanque. A temperatura do ar era de 31° C e a umidade relativa de 60%. O tratamento capinado consistiu de duas capinas, em 14-01-2000 e em 28-01-2000. Todos os tratamentos receberam a aplicação de sethoxydim (Apêndice 11.1.2) a 200 g.ha<sup>-1</sup>, para controle das gramíneas existentes na área, aos 20 dias após a emergência da soja.

Os demais tratos culturais exigidos para o desenvolvimento da cultura estiveram de acordo com as recomendações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (EPAGRI-CPPP, 1999). O rendimento de soja (GLXMA) foi obtido colhendo-se as duas linhas centrais da parcela, em 21-05-2000, numa área de 5,4 m<sup>2</sup>, corrigindo-se o peso para umidade de 13% e expresso em kg.ha<sup>-1</sup>.

No experimento com milho, o híbrido Braskalb SR 212 foi semeado em 02/12/99, com espaçamento de 80 cm entrelinhas e população final média de 60.000 plantas ha<sup>-1</sup>. Os tratamentos testados foram organizados em delineamento de blocos casualizados com cinco repetições. As unidades experimentais mediram 3,2 por 8,0 metros. Os tratamentos consistiram de atrazine, nas doses de 0, 840 e 1.680 g.ha<sup>-1</sup>; isoxaflutole nas doses de 0, 35 e 70 g.ha<sup>-1</sup>; com

tratamentos adicionais da associação de 840 g.ha<sup>-1</sup> de atrazine com 35 g.ha<sup>-1</sup> de isoxaflutole, e um tratamento capinado, totalizando, também, sete tratamentos. Os tratamentos com aplicação de herbicida foram realizados em pré-emergência das plantas cultivada e daninha em 04-12-1999, utilizando-se pulverizador costal pressurizado, conforme especificações já descritas, mas com seis bicos na barra. Os tratamentos representados por associação dos herbicidas, tiveram os produtos aplicados na forma de mistura em tanque. No momento da aplicação, a temperatura do ar era de 27° C e a umidade relativa de 60%. O tratamento capinado consistiu de duas capinas, em 17-12-1999 e em 08-01-2000. Como o híbrido utilizado é resistente ao sethoxydim (Apêndice 11.1.2), utilizou-se esse produto, na dose de 200 g.ha<sup>-1</sup>, aos 25 dias após a emergência da cultura, para controle das gramíneas que ocorreram no ensaio.

Os demais tratos culturais seguiram as recomendações existentes no Rio Grande do Sul para a cultura do milho (FEPAGRO, 1997). A colheita do milho (ZEAMD) ocorreu em 24-04-2000, corrigido o peso para umidade dos grãos de 13% e expresso em kg.ha<sup>-1</sup>.

O rendimento das duas culturas foram submetidos à análise da variância e comparação de médias foi realizada pelo teste Tukey, a 0,05 de probabilidade.

#### **7.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Analisando-se os resultados obtidos, verifica-se que não houve diferença significativa entre quaisquer tratamentos herbicidas no rendimento de soja (Tabela 7.1). Isto significa que nem a associação dos herbicidas metribuzin e clomazone, nem o emprego de doses mais elevadas que as usadas na associação, que correspondem às doses recomendadas para a cultura

(tratamentos metribuzin 384 g.ha<sup>-1</sup> e clomazone 800 g.ha<sup>-1</sup>), tiveram impacto negativo sobre o rendimento. A expressão dos resultados em porcentagem (relativos ao tratamento sem controle) permite verificar que os tratamentos produziram rendimentos semelhantes, com a variação entre eles sendo devido ao acaso. Esses resultados correspondem às observações visuais realizadas na cultura desde a sua emergência, em que não foram constatados sintomas aparentes de dano às plantas de soja.

TABELA 7.1. Médias de rendimento de grãos de soja (GLXMA) em resposta aos tratamentos aplicados. EEA UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 1999/00.

Tratamentos	Doses	Rendimento de grãos GLXMA	
		---g.ha <sup>-1</sup> ---	-----kg.ha <sup>-1</sup> ----- %-----
Tratamento capinado	-	1.124 a <sup>1</sup>	88 <sup>2</sup>
Tratamento sem herbicida	-	1.281 a	100
Metribuzin	192	1.246 a	97
Clomazone	400	1.306 a	102
Metribuzin + clomazone	192 + 400	1.198 a	94
Metribuzin	384	1.259 a	98
Clomazone	800	1.215 a	95
CV (%) <sup>3</sup>		22	

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

<sup>2</sup>Expresso em relação ao tratamento sem herbicida.

<sup>3</sup>CV = desvio padrão relativo.

Em trabalho em que foi utilizada a associação de metribuzin e clomazone sobre soja, em pré-emergência, em doses de 200 g.ha<sup>-1</sup> de metribuzin combinada com 280, 560 e 1.100 g.ha<sup>-1</sup>, não foram encontrados danos de dano à soja, com efeito sinérgico no controle de várias ervas (Westberg et al., 1989). Em outro experimento, entretanto, os mesmos autores verificaram níveis de 40% de dano na soja, nas doses de 560 g.ha<sup>-1</sup> de metribuzin com 1.100 g.ha<sup>-1</sup> de clomazone, embora sem reflexo no rendimento. Atribuíram o dano ao metribuzin e ao excesso de precipitação ocorrida, que colocou grande quantidade desse herbicida junto às raízes. Combinações de metribuzin a 0, 140, 280 e 560 g.ha<sup>-1</sup> e clomazone a 0,

420, 840 e 1.680 g.ha<sup>-1</sup>, em condições de casa-de-vegetação injuriaram plantas de soja. Mas o dano observada na associação nunca foi superior àquela encontrada nos tratamentos isolados e foram correlacionadas ao teor de matéria orgânica dos solos utilizados (Salzman & Renner, 1992; Scott & Weston, 1992).

No experimento com milho também não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, no rendimento de grãos da cultura (Tabela 7.2). Nem as doses recomendadas dos produtos para a cultura (tratamentos metribuzin 384 g.ha<sup>-1</sup> e clomazone 800 g.ha<sup>-1</sup>), nem a associação entre eles, com a metade destas doses, provocou redução no rendimento de grãos da cultura. A expressão dos resultados em porcentagem confirma a pequena variação entre os rendimentos, ficando restrita aos níveis da variação devido ao acaso. Também não foram constatados sintomas visíveis de dano à cultura ao longo do desenvolvimento da mesma.

TABELA 7.2. Médias de rendimento de grãos de milho (ZEAMD) em resposta aos tratamentos aplicados. EEA UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 1999/00.

Tratamentos	Doses (g.ha <sup>-1</sup> )	Rendimento de grãos ZEAMD	
		-----kg.ha <sup>-1</sup> -----	-----%-----
Tratamento capinado		8940 a <sup>1</sup>	115 <sup>2</sup>
Tratamento sem herbicida	0 + 0	7.806 a	100
Atrazine	840	8.910 a	114
Isoxaflutole	35	8.912 a	114
Atrazine + isoxaflutole	840 + 35	9.207 a	118
Atrazine	1680	8.085 a	104
Isoxaflutole	70	8.691 a	111
CV (%) <sup>3</sup>		18	

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

<sup>2</sup>Expresso em relação ao tratamento sem herbicida.

<sup>3</sup>CV = desvio padrão relativo.

Em trabalho semelhante, utilizando atrazine nas doses de 1.120 e 1.680 g.ha<sup>-1</sup>, em associação com isoxaflutole a 105 g.ha<sup>-1</sup>, também não foram encontrados sintomas de dano às plantas de milho (Young et al., 1999).

Já em outro trabalho (Sprague et al., 1999), foi observado dano à cultura de milho pelo uso da associação dos mesmos herbicidas. Os autores atribuíram o dano mais às condições de solo e precipitação pluviométrica, do que propriamente à associação dos herbicidas. Esses autores verificaram a presença de dano em apenas um local e, em outro não, ao que atribuíram diferenças nas condições do solo presente. Também o efeito diverso nos três anos estudados, foi atribuído às diferentes condições de precipitação que, quando mais intensa, mais dano provocou. Os resultados de rendimento obtidos refletiram os níveis de dano observados, com rendimentos sempre superiores nos locais onde não foram constatados sintomas de dano (Sprague et al., 1999).

O comportamento das associações apresentado nesses trabalhos parece permitir a não associação da ação sinérgica *per si*, com o maior dano do isoxaflutole quando em associação, como no caso do trabalho de Sprague et al. (1999). Se o isoxaflutole estivesse inibindo algum ou todos os mecanismos citados de destoxificação do atrazine pelo milho, certamente o dano da associação seria superior à encontrada para os herbicidas com outro mecanismo de ação, o que não foi o caso. Por outro lado, atrazine poderia inibir a tolerância do milho ao isoxaflutole. Como, ainda naquele mesmo trabalho, as diferenças de dano entre o tratamento isolado e em associação foram pequenas e houve ausência de dano em um dos locais estudados, possivelmente o atrazine não tenha influência direta sobre o mecanismo de tolerância do milho ao isoxaflutole (Sprague et al., 1999).

As associações entre inibidores do FS II e da síntese de carotenóides demonstraram não ser inibidoras dos processos de tolerância das culturas da soja



e milho aos herbicidas utilizados nesse trabalho, pertencentes a esses mecanismos de ação.

## 6.5. CONCLUSÕES

A associação dos herbicidas metribuzin e clomazone, nas doses de 192 e 400 g.ha<sup>-1</sup>, respectivamente, é seletiva à cultivar de soja Ft-Abyara.

A associação dos herbicidas atrazine e isoxaflutole, nas doses de 840 e 35 g.ha<sup>-1</sup>, é seletiva ao híbrido de milho Braskalb SR 212.

## **8. DISCUSSÃO GERAL**

O conjunto dos resultados apresentados e discutidos nos seis capítulos trouxeram um grande número de respostas e algumas novas perguntas sobre a questão geral alvo desta tese: a existência de sinergismo na associação de herbicidas inibidores do fluxo de elétrons do fotossistema II e herbicidas inibidores da síntese de carotenóides. Cada capítulo procurou tratar de um objetivo específico, visando que a sua análise conjunta atenda o objetivo geral estabelecido. É preciso, entretanto, situar os resultados em um contexto teórico que abranja a questão fisiológica e metodológica do sinergismo. Para tanto, a presente discussão geral abordará este contexto dividindo-o em cinco sessões, dentro das quais serão cotejadas as expectativas decorrentes do exame teórico da questão, com os resultados obtidos nos diversos experimentos conduzidos.

### **8.1. INTRODUÇÃO**

O emprego do controle químico no manejo das plantas daninhas trouxe grande versatilidade, redução de custos, aumento da eficiência e tem provocado grandes mudanças na forma de praticar agricultura. Nos tempos atuais, a maioria dos herbicidas são aplicados em associação e há expectativa de aumento de sua utilização. Nas associações de herbicidas, podem ocorrer interações na calda herbicida, na superfície das plantas, no solo, nos tecidos envolvidos na absorção

e translocação e no local de ação dentro da célula (Green & Bailey, 1987; Zimdahl, 1999).

Quando os herbicidas associados exibem sinergismo, as diversas vantagens já mencionadas na Introdução Geral, são acrescidas pela maior eficiência de controle e redução de dose em relação à associação aditiva, com as conseqüentes reduções de custo, menor poluição ambiental e menor chance de surgimento de resistência (Hatzios & Penner, 1985; Green & Bailey, 1987; Gressel, 1990; Streibig & Kudsk, 1993).

## 8.2. SINERGISMOS DOCUMENTADOS NA LITERATURA

Vários estudos tem sido conduzidos a fim de realizar um levantamento dos tipos de interação decorrentes da associação de herbicidas. Hatzios & Penner (1985) revisaram 267 exemplos de interações entre herbicidas relatadas até aquele momento. Vários outros trabalhos tem sido conduzidos desde então, no sentido de documentar os casos estudados e as chances de obtenção de um ou outro tipo de interação (Zhang et al., 1995).

O primeiro caso de sinergismo relatado foi com herbicidas hormonais. Os herbicidas 2,4-D ou 2,4-DB tem sido considerados sinérgicos em associação com atrazine sobre *Cyperus esculentus*, com chlorpropham sobre gramíneas, com picloram sobre *Convolvulus arvensis*, e outros. Um herbicida capaz de apresentar grande sinergismo é o Mefluidide. Associado com herbicidas como bentazon, acifluorfen, chlorsulfuron e sulfometuron sobre diversas ervas, apresenta efeito sinérgico bastante evidente. Mas nem sempre é sinergismo o resultado da associação. Vários casos em que apenas aditividade é constatada tem sido

relatados e, também, inúmeros casos de antagonismo (Green & Bailey, 1987; Green, 1989).

Objetivando ilustrar os vários trabalhos que revisaram os tipos de interação decorrentes das associações de herbicidas, associando-os com os mecanismos de ação, reuniu-se os resultados de Hatzios & Penner (1985) e Zhang et al. (1995) na Figura 8.1. Observa-se que tanto os casos de sinergismo como de antagonismo são distribuídos por todos mecanismos de ação, não havendo predominância de um ou outro tipo de interação para dois mecanismos específicos (Hatzios & Penner, 1985; Zhang et al., 1995).

### **8.3. MÉTODOS EMPREGADOS NO ESTUDO DO SINERGISMO**

Numerosas definições matemáticas tem sido propostas para a quantificação do desempenho das associações, a fim de demonstrar sinergismo. Até o momento ainda não existe consenso sobre como determinar qual a resposta biológica que deve ser esperada quando dois ou mais herbicidas são aplicados de forma associada. O método mais antigo, mais utilizado e o mais simples, é derivado da entomologia (fórmula de Abbott) e conhecido por método de Colby, neste trabalho tratado por método de Limpel. Este método é vantajoso pelo reduzido número de tratamentos necessários para demonstrar sinergismo, mas restringe as conclusões às doses estudadas (Green & Bailey, 1987; Gressel et al., 1993).

Mais recentemente tem sido empregado o método do isoblograma. Derivado da área da farmacologia, vale-se de curvas de resposta às doses para definição dos  $I_{50}$  que irão formar o isoblograma. Tem a vantagem de demonstrar sinergismo não como efeito de doses, mas da ação conjunta dos produtos

associados, em uma ampla faixa de doses. Mas requer um grande número de tratamentos, o que torna mais difícil sua aplicabilidade, principalmente a campo (Green & Bailey, 1987; Streibig et al., 1993; Gessner, 1995).

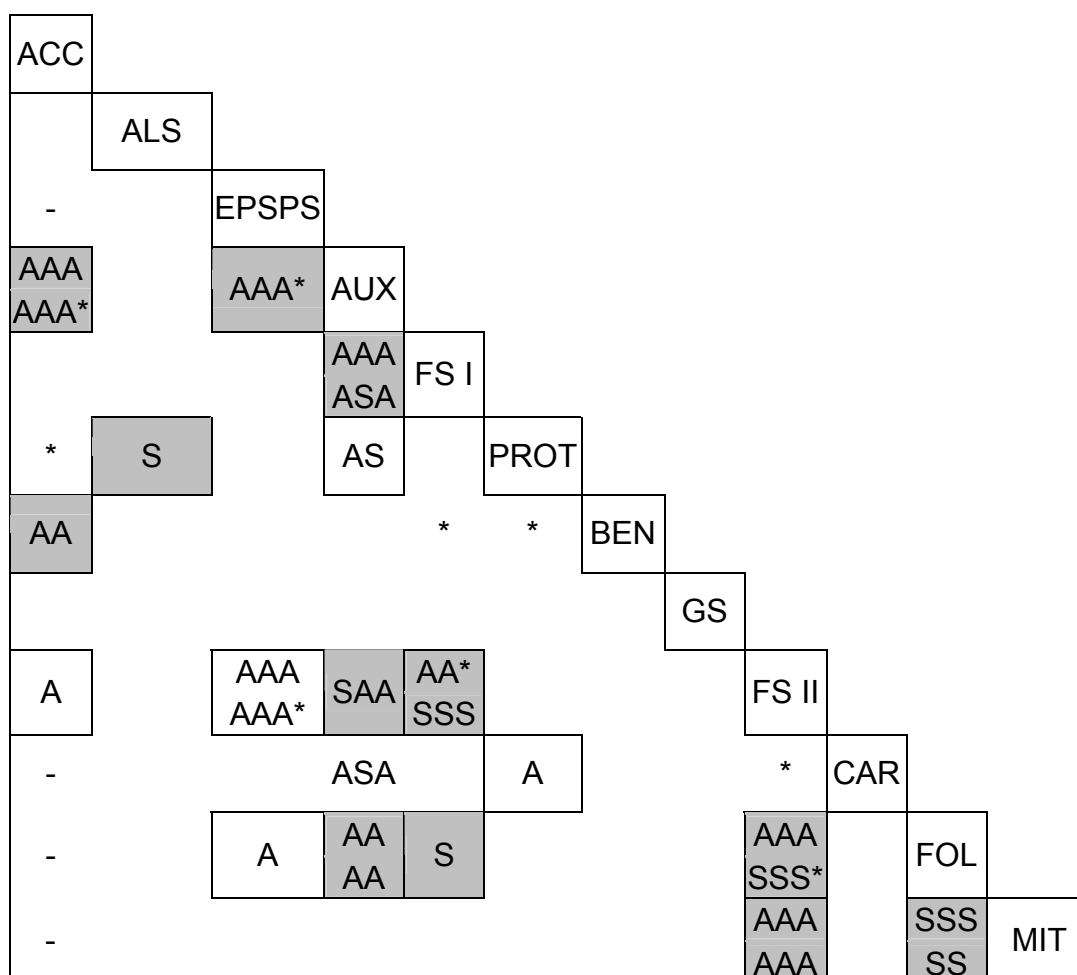


FIGURA 8.1. Relação entre os mecanismos de ação dos herbicidas e os casos constatados de sinergismo e antagonismo. S: sinergismo; A: antagonismo; -: associação não pertinente; \*: associação formulada a venda no Brasil; fundo cinza: mecanismo da interação conhecido; demais abreviaturas no Apêndice 11.2. (Adaptado de Hatzios & Penner, 1985 e Zhang et al., 1995).

#### 8.4. MODELO PARA DEMONSTRAÇÃO DE SINERGISMO

Diante das várias formas de demonstração de sinergismo existentes e empregadas, fica evidente a necessidade de desenvolver-se um modelo que contemple a abordagem do problema em todos seus aspectos. A manifestação do

sinergismo deve iniciar ao nível bioquímico, expandindo-se para o nível celular, para o nível do indivíduo e para o nível de comunidade, do ponto de vista da erva e da cultura. Tudo isto sustentado por um tratamento matemático/estatístico capaz de demonstrar inequivocamente o tipo de interação existente.

Por isso, buscou-se no presente trabalho, contemplar todos os níveis mencionados.

No nível bioquímico, buscou-se a comprovação de sinergismo através da determinação dos níveis de malondialdeído e do extravasamento eletrolítico do conteúdo celular. Enquanto o malondialdeído estima a ação dos herbicidas pelo estresse oxidativo, já que é o metabólito final deste processo, o extravasamento eletrolítico estima a consequência do estresse, ou seja, a ruptura das membranas das organelas e das células.

Pela estimativa do estresse oxidativo com a determinação dos níveis de malondialdeído, concluiu-se que houve sinergismo na associação dos herbicidas escolhidos como representantes dos dois mecanismos de ação: o metribuzin representando os inibidores do fluxo de elétrons no fotossistema II; e o clomazone representando os inibidores da síntese de carotenóides (Figura 2.1).

Da mesma forma, o extravasamento eletrolítico demonstrou que a associação dos herbicidas metribuzin e clomazone produziu estresse oxidativo bem superior ao dos herbicidas aplicados isoladamente (Figura 2.4). Estes resultados, embora restritos às doses estudadas, demonstram ao nível bioquímico, a existência de sinergismo.

Ao nível celular, a análise das eletromicrografias, através da quantificação de diferentes variáveis também produziu os mesmos resultados (Figuras 3.1, 3.2

e 3.3), evidenciando sinergismo ao nível celular, ou ultra-estrutural, ao nível do cloroplasto.

Estas conclusões, entretanto devem restringir-se às doses que foram estudadas, já que o método empregado foi o de Limpel et al. (1962).

Para demonstrar a existência de sinergismo ao nível de indivíduo e em complemento à metodologia de Limpel et al. (1962), foi aplicada a metodologia de curvas de resposta às doses sobre variáveis obtidas de plantas de girassol. Os resultados indicam sinergismo em pelo menos três das quatro associações para as quais estimou-se o efeito, com probabilidades superiores a 0,64, considerando-se a variável massa seca (Figura 4.8).

A demonstração de sinergismo ao nível de comunidade contou com a ênfase nas relações de interferência entre soja e girassol, com o girassol simulando a planta daninha, com ênfase na planta daninha *Bidens pilosa* e com ênfase na cultura. No primeiro caso, as condições experimentais não permitiram a comprovação de sinergismo. No segundo caso, houve comprovação através, das variáveis cobertura vegetal e percentual de controle. E no terceiro caso, houve a demonstração de que a possível ação sinérgica da associação não afetou a seletividade dos produtos à cultura.

## 8.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão de literatura disponível sobre associações de herbicidas, com particular interesse em sinergismo, demonstra que a sua comprovação é tarefa difícil, complexa e vários equívocos tem sido praticados. Este trabalho confirma esta dificuldade e indica que, mesmo abordando-se a análise em vários níveis, a comprovação persiste sendo sujeita a incertezas. O modelo de estudo

desenvolvido é inédito na área de plantas daninhas e, com aperfeiçoamentos, pode conduzir a um modelo útil e aplicável.



## **9. CONCLUSÕES GERAIS**

A comprovação a campo de interação sinérgica mostra-se bastante complexa e depende dos herbicidas envolvidos, suas doses e persistência, as espécies de plantas daninhas alvo e a própria metodologia de avaliação.

A existência de sinergismo entre os herbicidas inibidores do fluxo de elétrons do fotossistema II e da síntese de carotenóides depende das doses que são aplicados os herbicidas.

As evidências de sinergismo ao nível bioquímico e celular na associação dos herbicidas metribuzin e clomazone são intensas e se manifestam com razoável probabilidade ao nível de indivíduo.

Ao nível de comunidade, as evidências de sinergismo entre os herbicidas metribuzin e clomazone limitam-se a variáveis menos objetivas, pela grande variabilidade experimental ocorrida em condições de lavoura.

A interação existente entre herbicidas como metribuzin e clomazone e atrazine e isoxaflutole não compromete a seletividade destes herbicidas às culturas em que são empregados.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENS, W.H. **Herbicide handbook**. 7 ed. Champaign: Weed Science Society of America, 1994, 104 p.
- AKOBUNDU, I.O.; DUKE, W.B.; SWEET, R.D.; MINOTTI, P.L. Basis for synergism of atrazine and alachlor combinations on japanese millet. **Weed Science**, Champaign, v. 23, n.1, p.43-48, 1975a.
- AKOBUNDU, I.O.; SWEET, R.D.;DUKE, W.B. A method of evaluating herbicide combinations and determining herbicide synergism. **Weed Science**, Champaign, v.23, n.1, p.20-25, 1975b.
- ASHTON, F.M.; CRAFTS, A.S. **Mode of action of herbicides**. 2 ed. Nova York: Wiley-Interscience, 1981. 525p. Cap. 19: Triazines.
- BARTELS, P.G. Effects of herbicides on chloroplast and cellular development. In: DUKE, S.O. (Ed.) **Weed physiology**. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc., 1985. 2v. V2. p.63-90.
- BLACKSHAW, R.E.; O'DONOVAN, J.T.; SHARMA, M.P.; HARKER, K.N.; MAURICE, D. Response of triallate-resistant wild oat (*Avena fatua*) to alternative herbicides. **Weed Technology**, Champaign, v.10, n.3, p.258-262, 1996.
- BOVEY, R.W.; WHISENANT, S.G. Honey mesquite (*Prosopis glandulosa*) control by synergistic action of clopyralid:triclopyr mixtures. **Weed Science**, Champaign, v.40, n.4, p.563-567, 1992.
- BUCHANAN,B.B.; GRUISSEM, W.; RUSSELL, L.J. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2001a. 1367p. Parte 1: Compartments.
- BUCHANAN,B.B.; GRUISSEM, W.; RUSSELL, L.J. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2001b. 1367p. Parte 3: Energy flow.
- CAMPBELL, T.A.; GENTNER, W.A.; DANIELSON, L.L. Evaluation of herbicide interactions using linear regression modeling. **Weed Science**, Champaign, v.29, n.4, p.378-381, 1981.
- CARTER JUNIOR, W.H. Relating isobolograms to response surfaces. **Toxicology**, Limerick, v.105, n.12, p.181-188, 1995.
- CASADORO, G.; RASCIO, N.Plastid ultrastructural features in the various tissues of sunflower leaves. **Cytobios**, Cambridge, v.24, n.1, p.157-166, 1979.
- CHISM, W.J.; BIRCH, J.B.; BINGHAM, S.W. Nonlinear regressions for analyzing growth stage and quinclorac interactions. **Weed Technology**, Champaign, v.6, n.4, p.898-903, 1996.

COLBY, S.R. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. **Weeds**, Columbus, v.15, n.1, p.20-22, 1967.

DAYAN, F.E.; WEETE, J.D.; DUKE, S.O.; HANCOCK, H.G. Soybean (*Glycine max*) cultivar differences in response to sulfentrazone. **Weed Science**, Lawrence, v.45, n.6, p.634-641, 1997.

DEVINE, M., DUKE, S.O., FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. Englewood Cliffs, NJ: PTR Prentice Hall, 1993a. 441 p.Cap. 7: Herbicidal inhibition of photosynthetic electron transport.

DEVINE, M., DUKE, S.O., FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. Englewood Cliffs, NJ: PTR Prentice Hall, 1993b. 441 p.Cap. 8: Other herbicidal interactions with photosynthesis.

DEVINE, M., DUKE, S.O., FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. Englewood Cliffs, NJ: PTR Prentice Hall, 1993c. 441 p.Cap. 9: Oxygen toxicity and Herbicidal action.

DEVINE, M., DUKE, S.O., FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. Englewood Cliffs, NJ: PTR Prentice Hall, 1993d. 441 p.Cap. 17: Herbicide interactions with herbicides, synergists, and safeners.

DRURY, R.E. Physiological interaction, its mathematical expression. **Weed Science**, Champaign, v.28, n.5, p.573-579, 1980.

DUKE, S.O.; KENYON, W.H.; PAUL, R.N. Effects on chloroplast development in pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*) cotyledons. **Weed Science**, Champaign, v.33, n.6, p.786-794, 1985.

FAHN, A. **Plant Anatomy**. 3 ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. 544p. Cap.2: The Cell.

FAYEZ, K.A. Action of photosynthetic diuron herbicide on cell organelles and biochemical constituents of the leaves of two soybean cultivars. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 66, n.3, p.105-115, 2000.

FEPAGRO. **Recomendações técnicas para a cultura do milho no RS**. Porto Alegre, RS: FEPAGRO, EMATER/RS, FECOTRIGO, 1997. 140 p.(Boletim Técnico, n.4)

FLECK, N.G.; CANDEMIL, C.R.G. Interferência de plantas daninhas na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.25, n.1, p.27-32, 1995.

FLECK, N.G.; MENGARDA, I.P.; PINTO, J.J.O. Interferência de plantas daninhas na cultura do girassol. Competição no espaço. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.9, p.1131-1137, 1989.

FLECK, N.G.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores do fotossistema 2. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO Jr., A. (Eds.) **Herbicidologia**. Porto Alegre: Vidal, R.A. & Merotto Jr., A., 2001. p.100-112.

FLINT, J.L; CORNELIUS, P.L.; BARRETT, M. Analyzing herbicide interactions: a statistical treatment of Colby's method. **Weed Technology**, Champaign, v.2, n.3, p.304-309, 1988.

- FRANS, R.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: Southern Weed Science Society. **Research methods in weed science**, Clemson, 3<sup>a</sup> ed. p.29-45, 1986.
- FREEMAN, T.P.; DUYSSEN, M.E.; GULYA, T.J. Ultrastructural changes in sunflower chloroplasts following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.72, n.5, p.707-714, 1985.
- FUERST, E.P.; NORMAN, M.A. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. **Weed Science**, Champaign, v.39, n.3, p.458-464, 1991.
- GALLAHER, K.; MUELLER, T.C. Effect of crop presence on persistence of atrazine, metribuzin and clomazone in surface soil. **Weed Science**, Champaign, v.44, n.3, p.698-703, 1996.
- GESSNER, P.K. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. **Toxicology**, Limerick, v.105, n.12, 1995.
- GIBSON, D.J.; CONNOLLY, J.; HARTNETT, D.C.; WEIDENHAMER, J.D. Designs for greenhouse studies of interactions between plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v.87, n.1, p.1-16, 1999.
- GOWING, D.P. Comments on tests of herbicide mixtures. **Weeds**, Columbus, v.8, n.3, p.379-391, 1967.
- GREEN, J. Herbicide antagonism at the whole plant level. **Weed Technology**, Champaign, v.3, n.2, p.217-226, 1989.
- GREEN, J.M.; STREIBIG, J.C. Herbicide Mixtures. In: STREIBIG, J.C.; KUDSK, P. **Herbicide bioassays**. Florida: CRC Press Inc., 1993. p.117-135.
- GREEN, J.M.; BAILEY, S.P. Herbicide interactions with herbicides and other agricultural chemicals. In: McWHORTER, C.G.; GEBHARDT, M.R. **Methods of applying herbicides**. Champaign: WSSA, 1987. p.37-61.
- GRESSEL, J. Synergizing herbicides. **Reviews of Weed Science**, Champaign, v.5. p.49-82, 1990.
- GRESSEL, J.; SHAALTIEL, Y.; SHARON, A.; AMSELLEM, Z. Biorational in vitro screening for herbicide synergists. In: STREIBIG, J.C. & KUDSK, P. **Herbicide bioassays**. Boca Raton, Ca.: CRC Press, 1993. p.217-252.
- GRONWALD, J.W. Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. In: POWLES, S.; HOLTUM, J. (eds.) **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.27-60.
- HALL, D.O.; RAO, K.K. **Fotossíntese**. São Paulo: EPU/EDUSP, 1980. 89 p.
- HALSTEAD, S.J.; HARVEY, R.G. Effect of rate and carrier on clomazone movement off-site. **Weed Technology**, Champaign, v.2, n.2, p.179-182, 1988.
- HAMILL, A.S.; PENNER, D. Interaction of alachlor and carbofuran. **Weed Science**, Champaign, v.21, n.4, p.330-335, 1973.
- HANAICHI, T.; SATO, T.; IWAMOTO, T.; MALAVASIYAMASHIRO, J.; HOSHIRO, M. e MIZUNO, N.. A stable lead by modification of Sato method. **Journal of Electron Microscopy**, Oxford, v.35, n.3, p.304-306, 1986.

HATZIOS, K.K.; PENNER, D. Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. **Reviews of Weed Science**, Champaign, v.1. p.1-63, 1985.

HESS, F.D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, Lawrence, v.48, n.2, p.160-170, 2000.

HEWITT, E.J. **Sand an water culture methods used in the study of plant nutrition**. 2. ed. Commonwealth Agricultural Bureau. Londres, 1966. 547 p. Cap. 8: The composition of nutrient solution.

HILL, E.R.; PUTALA, E.C.; VENGRIS, J. Atrazine-induced ultrastructural changes of barnyardgrass chloroplasts. **Weed Science**, Champaign, v.16, n.3, p.377-380, 1968.

HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, Limerick, v.207, n.4, p.604-611, 1999.

HODGES, D.M.; FORNEY, C.F. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, n.344, p.645-655, 2000.

HUANG, B.R.; DUNCAN, R.R.; CARROW, R.N. Drought-resistance mechanisms of seven warm-season turfgrasses under surface soil drying: II. root aspects. **Crop Science**, Madison, v.37, n.6, p.1863-1869, 1997.

JOHNSON, D.H.; TALBERT, R.E. Imazaquin, chlorimuron, and fomesafen may injure rotational vegetables and sunflower (*Helianthus annuus*). **Weed Technology**, Champaign, v.7, n.3, p.573-577, 1993.

JOHNSON, D.H.; YOUNG, B.G. Influence of temperature and relative humidity on the foliar activity of mesotrione. **Weed Science**, Lawrence, v.50, n.2, p.157-161, 2002.

KENYON, W.H.; DUKE, S.O.; VAUGHN, K.C. Sequence of effects of acifluorfen on physiological and ultrastructural parameters in cucumber cotyledon discs. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.24, n.2, p.240-250, 1985.

KIM, S.; HAN, S.; VANDEN BORN, W.H. Effect of chlorsulfuron on assimilate transport: ultrastructural implications. **Weed Science**, Lawrence, v.45, n.4, p.470-473, 1997.

KISSMANN, K.G., GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo II. São Paulo: BASF Brasileira S.A., 1993. 798 p.

KRUSE, N.D. Inibidores da síntese de carotenóides. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO Jr., A. (Eds.) **Herbicidologia**. Porto Alegre: Vidal, R.A. & Merotto Jr., A., 2001. p.113-122.

KWON, T.; MENZEL, D.B.; OLCOTT, H.S. Reactivity of malonaldehyde with food constituents. **Journal of Food Science**. Champaign, v.30, n.1, p.818-813, 1965.

LEE, D.L.; PRISBYLLA, M.P.; CROMARTIE, T. H. et al. The discovery and structural requirements of inhibitors of *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Weed Science**, Lawrence, v.45, n.4, p.601-609, 1997.

- LI, Z.; WALKER, R.H.; WEHTJE, G.; HANCOCK, H.G. Using electrolyte leakage to detect soybean (*Glycine max*) cultivars sensitive to sulfentrazone. **Weed Technology**, Lawrence, v.14, n.4, p.699-704, 2000.
- LIEBL, R.A.; NORMAN, M.A. Mechanism of clomazone selectivity in corn (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*), smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). **Weed Science**, Champaign, v.39, n.3, p.329-332, 1991.
- LIMPEL, L.E.; SCHULDT, P.H.; LAMONT, D. Weed control by dimethyl tetrachloroterephthalate alone and in certain combinations. **Proceedings of northeastern weed control conference**. v.16, [SN] p.48-53, 1962.
- LYON, D.J.; ANDERSON, R.L. Crop response to fallow applications of atrazine and clomazone. **Weed Technology**, Champaign, v.7, n.4, p.949-953, 1993.
- MATTHEWS, J.M. Management of herbicide resistant weed populations. In: POWLES, S.; HOLTUM, J. (eds.) **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC, 1994. p.317-335.
- MITICH, L.W. Beggarticks. **Weed Technology**, Champaign, v.8, n.1, p.172-175, 1994.
- MOLAS, J. Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni(II) complexes. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, n.47, p.115-126, 2002.
- MORSE, P.M. Some comments on the assessment of joint action in herbicide mixtures. **Weed Science**, Champaign, v.26, n.1, p.58-71, 1978.
- MOTSENBOCKER, C.E.; MONACO, T.J. Differential tolerance of sweet potato (*Ipomoea batatas*) clones to metribuzin. **Weed Technology**, Champaign, v.7., n.2, p.349-354, 1993.
- MOTULSKY, H.J.; RANSNAS, L.A. Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. **FASEB Journal**, San Diego, v.1, n.5, p.365-374, 1987.
- NASH, R.G. Phytotoxic interaction studies - techniques for evaluation and presentation of results. **Weed Science**, Champaign, v.29, n.2, p.147-155, 1981.
- 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**, Rockville, v.92, n.5, p.777-784, 1990.
- PALLET, K.E.; DODGE, A.D. Studies into the action of some photosynthetic inhibitor herbicides. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.31, n.123, p.1051-1066, 1980.
- PROCHAZKOVA, D.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C.; SINGH, D.V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. **Plant Science**, Limerick, v.161, n.4, p.765-771, 2001.
- RADOSEVICH, S.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Weed ecology: implications for management**. 2. ed. New York: Wiley, 1997. 330p. Cap. 5: Associations of weeds and crops.

RAMAKRISHNAN, R.; JUSKO, W.J. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v.1, n.12, 2001.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 29, 2001, Porto Alegre. **Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina 2001/2002**. Porto Alegre: Fepagro, 2001. 138p.

RIBOLDI, J. **Cadernos de matemática e estatística**: análise de regressão e correlação. Instituto de Matemática - UFRGS, série B, nº 30, 75 p.1995b.

RIBOLDI, J. **Cadernos de matemática e estatística**: análise de variância. Instituto de Matemática - UFRGS, série B, nº 27 105 p.1995a.

RIBOLDI, J. **Cadernos de matemática e estatística**: Elementos básicos de estatística. Instituto de Matemática - UFRGS, série B, nº 14 61 p.1993.

RIZZARDI, M.A. **Nível de dano econômico para tomada de decisão no controle de picão-preto (*Bidens spp.*) e guanxuma (*Sida rhombifolia L.*) na cultura da soja**. 2002. 177 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ROCHA, O.J. The effects of achene heteromorphism on the dispersal capacity of *Bidens pilosa* L. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.157, n.3, p.316-322, 1996.

ROLAND, J.C. e VIAN, B. General Preparation and Staining of Thin Sections. In: HALL, J.L e HAWES, C. (eds.) **Electron Microscopy of Plant Cells**, Londres, Academic Press, p.1-66, 1991.

RUMEMNS, F.H.A. An improved definition of synergistic and antagonistic effects. **Weed Science**, Champaign, v.23, n.1, p.4-6, 1975.

RUMEMNS, F.H.A.; RUMMENS-DITTERS, D.C.M.; SMITH, A.E. The effects of diallate and its isomers on the growth of wild oats. **Weed Science**, Champaign, v.23, n.1, p.11-14, 1975.

SALZMAN, F.P.; RENNER, K.A. Response of soybean to combinations of clomazone, metribuzin, linuron, alachlor, and atrazine. **Weed Technology**, Champaign, v.6, n.4 p.922-929, 1992.

SANDMANN, G.; SCHMIDT, A.; LINDEN, H. et al. Phytoene desaturase, the essential target for bleaching herbicides. **Weed Science**, Champaign, v.39, n.3, p.474-479, 1991.

SAS - Institute Statistical Analysis System. **User's guide**. Version 6.4. ed. Cary: SAS Institute. 1989. 846 p.

SCOTT, J.E.; WESTON, L.A. Cole crop (*Brassica oleracea*) tolerance to clomazone. **Weed Science**, Champaign, v.40, n.1, p.7-11, 1992.

SCOTT, J.E.; WESTON, L.A.; CHAPPELL, J.; HANLEY, K. Effects of clomazone on ipp isomerase and prenyl transferase activities in cell suspension cultures and cotyledons of solanaceous species. **Weed Science**, Champaign, v.42, n.4, p.509-516, 1994.

SEEFELDT, S.S.; JENSEN, J.E.; FUERST, p. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, Champaign, v.9, n.2, p.218-225, 1995.

SILVA, J.F.; WARREN, G.F. Effect of stage of growth on metribuzin tolerance. **Weed Science**, Champaign, v.24, n.6, p.612-615, 1976.

SIMPSON, D.M.; STOLLER, E.W. Physiological mechanisms in the synergism between thifensulfuron and imazethapyr in sulfonylurea-tolerant soybean (*Glycine max*). **Weed Science**, Champaign, v.44, n.2, p.209-214, 1996.

SOUZA, A.P.; FERREIRA, F.; SILVA, A.A.; CARDOSO, A.A.; RUIZ, H.A. Uso da equação logística no estudo de dose-resposta de glyphosate e imazapyr por meio de bioensaios. **Planta Daninha**, Botucatu, v.18, n.1, p.17-28, 2000

SPRAGUE, C.L.; KELLS, J.J.; PENNER, D. Weed control and corn (*Zea mays*) tolerance from soil-applied RPA 201772. **Weed Technology**, Lawrence, v.13, n.4, p.713-725, 1999.

SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, Nova York, v.26, n.1, p.31-34, 1969.

STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 2. ed. New York: McGraw-Will Book Company, Inc., 1980. 633p. Cap 5: Comparisons involving two sample means.

STREIBIG, J.C. A method for determining the biological effect of herbicide mixtures. **Weed Science**, Champaign, v.29, n.4, p.469-473, 1981.

STREIBIG, J.C. Joint action of root-absorbed mixtures of auxin herbicides in *Sinapis alba* L. and barley (*Hordeum vulgare* L.) **Weed Research**, Londres, v.27, n.3, p.337-347, 1987.

STREIBIG, J.C.; DAYAN, F.E.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Joint action of natural and synthetic photosystem II inhibitors. **Pesticide Science**, Londres, v.55, n.2, p.137-146, 1999.

STREIBIG, J.C.; KUDSK, P.; JENSEN, J.E. A general joint action model for herbicide mixtures. **Pesticide Science**, Londres, v.53, n.1, p.21-28, 1998.

STREIBIG, J.C.; RUDEMO, M.; JENSEN, J.E. Dose-response curves and statistical models. In: STREIBIG, J.C.; KUDSK, P. **Herbicide bioassays**. Florida: CRC Press Inc., 1993. p.29-55.

TAMMES, P.M.L. Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. **Netherland Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.70, n.2, p.73-80, 1964.

THIÉRY, J.P. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. **Journal de Microscopie**, Paris, v.6, n.4, p.987-1018, 1967.

TIETJEN, K.G.; KLUTH, J.F.; ANDREE, R. et al. The herbicide binding niche of photosystem II - a model. **Pesticide Science**, Oxford, v.31, n.1, p.65-72, 1991.

TOWERS, G.H.N.; ARNASON, J.T. Photodynamic herbicides. **Weed Technology**, Champaign, v.2, n.4, p.545-549, 1988.



- VELIKOVA, V.; IORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Limerick, v.151, n.1, p.59-66, 2000.
- VENCILL, W.K.; HATZIOS, K.K.; WILSON, H.P. Absorption, translocation, and metabolism of <sup>14</sup>C-clomazone in soybean (*Glycine max*) and three *Amaranthus* weed species. **Journal of Plant Growth Regulation**, Nova York, v.9, n.1, p.127-132, 1990.
- VIDAL, R.A. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre: R.A. Vidal, 1997. 165 p.
- VIEIRA SANTOS, C.L.; CAMPOS, A.; AZEVEDO, H.; CALDEIRA, G. *In situ* and *in vitro* senescence induced by KCL stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, n.355, p.351-360, 2001.
- WEBER, M. The formation of pollenkitt in *Apium nodiflorum* (Apiacea). **Annals of Botany**, Londres, v.70, n.3, p.573-577, 1992.
- WEBER, M. The existence of a special exine coating in *Geranium robertianum* pollen. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.157, n.2, p.195-202, 1996.
- WESTBERG, D.E.; OLIVER, L.R.; FRANS, R.E. Weed control with clomazone alone and with other herbicides. **Weed Technology**, Champaign, v.3, n.4, p.678-685, 1989.
- WRISCHER, M.; LJUBESIC, N.; DEVIDE, Z. Ultrastructural studies of degradational processes in amitrole-damaged photosynthetic membranes. **Journal of structural biology**, Duluth, Minn, v.108, n.1, p.1-5, 1992.
- WRUBEL, R.P.; GRESSEL, J. Are herbicide mixtures useful for delaying the rapid evolution of resistance? a case study. **Weed Technology**, Champaign, v.8, n.3, p.635-648, 1994.
- YOUNG, B.G.; HART, S.E.; SIMMONS, F.W. Preemergence weed control in conventional-till corn (*Zea mays*) with RPA 201772. **Weed Technology**, Lawrence, v.13. n.4, p.471-477, 1999.
- ZHANG, J.; HAMILL, A. S.; WEAVER, S.E. Antagonism and synergism between herbicides: trends from previous studies. **Weed Technology**, Champaign, v.9., n.1, p.86-90, 1995.

## 11. APÊNDICES

### APÊNDICE 11.1. GLOSSÁRIO

#### 11.1.1. Glossário Geral

Aducto: composto formado pela adição de uma ou mais moléculas a outra.

Envelope: membranas externa e interna que revestem o cloroplasto.

Plastoglóbulos: glóbulos com lipídios que acumulam-se nos cloroplastos.

Coeficiente de extinção molar: quantidade de luz perdida por dispersão ou absorção, por unidade de distância (Lei Beer-Lambert:  $A = \epsilon C \ell$ , onde  $A$  = absorvância (em unidades OD);  $\epsilon$  = coeficiente de extinção molar (M) em  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $C$  = concentração (M);  $\ell$  = distância percorrida, tipicamente 1 cm.

#### 11.1.2. Glossário de nomes químicos

Acifluorfen: {ácido 5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenóxi]2-nitrobenzóico} e bentazon [3-(1-metiletil)-(1H)-2,1,3-benzotiadiazina-4(3H)-ona 2,2-dióxido].

Assist: óleo mineral parafínico. Lote 043/01/25.000. Fabricação junho 2001. Validade junho 2006.

Atrazine: (6-cloro-*N*-etil-*N'*-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina).

Clomazone: (2-[(2-clorofenil)metil]-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona); peso molecular = 239,7 g; 2,09  $\text{mols L}^{-1}$  (=molar (M)) no produto comercial "Gamit 500 CE". Lote 005/99/5.800. Fabricação fevereiro 1999. Validade fevereiro 2002.

DIMBOA: (2,4-dihidróxi-7-metóxi-1,4(2H)-benzoxazin-3(4H)-ona).

Glyphosate (*N*-(fosfonometil) glicina).

Isoxaflutole: (5-ciclopropil-4-(2-metilsulfonil-4-trifluorometil-benzoil)isoxazole).

Metribuzin: (4-amino-6-(1,1-dimetiletil)-3-metiltio-1,2,4-triazin-5(4H)-ona); peso molecular = 214,3 g; 2,24  $\text{mols L}^{-1}$  (=molar (M)) no produto comercial "Sencor 480". Lote 004/1997/2.808. Fabricação outubro 1997. Validade outubro 1999. Lote 001/99. Fabricação janeiro 1999. Validade dezembro 2002.

NTBC: 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-ciclohexano-1,3-dione.

Norflurazon: (4-cloro-5-(metilamino)-2-(3-(trifluorometil)fenil)-3-(2H)-piridazinona).

Sethoxydim: (2-[-(etoxiimina)butil]-5-{2-(etiltio)propil}-3-hidroxi-2-ciclohexeno-1-ona).

TCA: ácido tricloro acético

## APÊNDICE 11.2. ABREVIATURAS

$\mu\text{M}$ : micromolar.

$\text{O}_2^-$ : superóxido.

$^1\text{O}_2$ : oxigênio singleto

$^3\text{Chl}$ : clorofila tripleto.

ACC: inibidores de ACCase (Acetil CoA carboxilase).

ALS: inibidores de ALS (Aceto Lactato Sintase).

AUX: mimetizadores de auxina.

BEN: Bentazon.

BIDPI: *Bidens pilosa*.

CAR: inibidores da síntese de carotenóides.

cm: centímetro.

$\text{CO}_2$ : gás carbônico.

$\text{D}_1$ : proteína  $\text{D}_1$ .

$\text{D}_2$ : proteína  $\text{D}_2$ .

DAA: dias após aplicação.

dm: decímetro.

EEA: Estação Agronômica da UFRGS.

EPSPS: inibidores de EPSPS (Enol Piruvil Shiquimato Fosfato Sintase).

FOL: inibidores do crescimento da parte aérea.

FS I: fotossistema I.

FS I: inibidores do FS I.

FS II: fotossistema II.

FS II: inibidores do FS II.

g: grama.

GLXMA: *Glycine max*.

GS: inibidores de GS (Glutamina sintetase).

$\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrogênio.

HPPD: 4-hidróxi fenil piruvato dioxigenase.

$I_{50}$ : dose necessária para provocar 50% de inibição do desenvolvimento.

I<sub>comb.</sub>: índice de combinação.

kg: kilograma.

MDA: malondialdeído.

MIT: inibidores da mitose.

mM: milimolar.

MS: massa seca.

MV: massa verde.

NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato.

nM: nanomolar.

°C: graus Celsius.

OH<sup>\*</sup>: radical hidroxila.

P<sub>680</sub>: pigmento do fotossistema II com absorção de luz a 680 nm.

PDS: fitoeno desaturase.

PET: polietileno tereftalato.

PQ: plastoquinona.

PQH<sub>2</sub>: plastohidroquinona.

PROT: inibidores de PROTOX (Protoporfirinogênio Oxigenase).

Q<sub>A</sub>: quinona A.

Q<sub>B</sub>: quinona B.

R<sup>\*</sup>: radical livre.

TBA: ácido tiobarbitúrico.

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ZEAMD: *Zea mays*.

APÊNDICE 11.3. Absorbância a 532 e 600 nm (médias de quatro repetições) de amostras com e sem TBA de folhas de girassol, em resposta à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Tratamentos	Com TBA		Sem TBA	
	532 nm	600 nm	532 nm	600 nm
Tratamento sem herbicida	0,045	0,015	0,002	0,001
Metribuzin 0,28 $\mu$ M	0,036	0,009	0,003	0,002
Clomazone 80 $\mu$ M	0,130	0,100	0,154	0,155
Metribuzin + clomazone	0,110	0,022	0,310	0,304

APÊNDICE 11.4. Rotina de análise da variância proposta por Flint et al., 1988, para o aplicativo computacional SAS<sup>®</sup>, concebida para conferir tratamento estatístico à fórmula de Limpel (Limpel et al., 1964), modificada por Colby (Colby, 1967). O exemplo abaixo prevê a utilização de dois herbicidas, aplicados isolados e em associação, com uma dose para cada herbicida, pré-determinada para produzir 50% do efeito máximo, e três variáveis resposta para análise.

```
“data;
infile 'c:\arquivo.prn';
input A B rep mdaeQC;
array xa(i) a1;
array xb(j) b1;
array xab(k) ab11;
k=0;
do i=1 to 1; xa=(a=i);
do j=1 to 1; xb=(b=j);
do j=1 to 1; xb=(b=j);
k=k+1;
xab=xa*xb;
end;
end;
end;
array xr(m) r1-r3;
do m=1 to 3;
xr=(rep=m)-(rep=4);
end;
proc print;
proc glm;
model mdaeQC =r1-r3 a1 b1 ab11;
run;”
```

APÊNDICE 11.5. Resultado da análise da variável eq. MDA C, rodada no aplicativo computacional SAS®, segundo Flint et al., 1988.

```

The SAS System                22:18 Saturday, mars 17, 2001    1

Obs A B rep mdaeQC i a1 j b1 k ab11 m r1 r2 r3

  1 0 0  1  13.423 2  0 3  0 1  0  4  1  0  0
  2 0 0  2   8.462 2  0 3  0 1  0  4  0  1  0
  3 0 0  3  12.692 2  0 3  0 1  0  4  0  0  1
  4 0 0  4  10.385 2  0 3  0 1  0  4 -1 -1 -1
  5 1 0  1  11.923 2  1 3  0 1  0  4  1  0  0
  6 1 0  2  10.000 2  1 3  0 1  0  4  0  1  0
  7 1 0  3   8.077 2  1 3  0 1  0  4  0  0  1
  8 1 0  4   9.615 2  1 3  0 1  0  4 -1 -1 -1
  9 0 1  1  11.154 2  0 3  1 1  0  4  1  0  0
 10 0 1  2  10.385 2  0 3  1 1  0  4  0  1  0
 11 0 1  3  13.846 2  0 3  1 1  0  4  0  0  1
 12 0 1  4  11.923 2  0 3  1 1  0  4 -1 -1 -1
 13 1 1  1  32.692 2  1 3  1 1  1  4  1  0  0
 14 1 1  2  31.923 2  1 3  1 1  1  4  0  1  0
 15 1 1  3  35.000 2  1 3  1 1  1  4  0  0  1
 16 1 1  4  26.154 2  1 3  1 1  1  4 -1 -1 -1

The SAS System                22:18 Saturday, mars 17, 2001    5

```

The GLM Procedure

Dependent Variable: mdaeQC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	1288.434489	214.739081	41.98	<.0001
Error	9	46.034169	5.114908		
Corrected Total	15	1334.468658			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	z Mean
0.965504	14.04436	2.261616	16.10338

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
r1	1	15.4429031	15.4429031	3.02	0.1163
r2	1	1.3675600	1.3675600	0.27	0.6176
r3	1	9.0185341	9.0185341	1.76	0.2169
a1	1	334.1035623	334.1035623	65.32	<.0001
b1	1	489.5156250	489.5156250	95.70	<.0001
ab11	1	438.9863040	438.9863040	85.82	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
r1	1	7.6113541	7.6113541	1.49	0.2535
r2	1	4.4250307	4.4250307	0.87	0.3766
r3	1	9.0185341	9.0185341	1.76	0.2169
a1	1	3.5738011	3.5738011	0.70	0.4249
b1	1	0.6879645	0.6879645	0.13	0.7223
ab11	1	438.9863040	438.9863040	85.82	<.0001

Parameter	Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	11.24050000	1.13080808	9.94	<.0001
r1	1.19462500	0.97930853	1.22	0.2535
r2	-0.91087500	0.97930853	-0.93	0.3766
r3	1.30037500	0.97930853	1.33	0.2169
a1	-1.33675000	1.59920413	-0.84	0.4249
b1	0.58650000	1.59920413	0.37	0.7223
ab11	20.95200000	2.26161617	9.26	<.0001

APÊNDICE 11.6. Resumo da análise da variância dos resultados dos experimentos de curva de resposta às doses para metribuzin e clomazone, aplicados sobre discos foliares de girassol, onde mediu-se o extravasamento eletrolítico, através da condutividade eletrolítica ( $\mu\text{mho.cm}^{-1}$ ). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Causas da variação	F calculado		
	GL <sup>1</sup>	Metribuzin	Clomazone
Dose	6	175	318
Resíduo	14	--	--
QM do erro		917	795
Probabilidade		< 0,001	< 0,001
CV (%) <sup>2</sup>		3,4	3,2

<sup>1</sup>GL= graus de liberdade; SQ= soma de quadrados; QM= quadrado médio; F= estatística F.

<sup>2</sup>Desvio padrão relativo.



APÊNDICE 11.7. Rotina de análise da variância e regressão não linear do aplicativo computacional SAS<sup>®</sup>, aplicada sobre resultados de grupos de tratamentos concebidos para formação de curvas de resposta às doses de metribuzin e clomazone aplicados isolados e em associação, segundo Seefeldt et al. (1995). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

```
data rnlín;
infile 'c:\dados.prn';
input dose bmv;
if dose>0 then logdose=log(dose);
else logdose=log(70/2);
run;
proc print data=rnlín;
proc plot data=rnlín;
plot bmv*logdose;
run;
proc glm data=rnlín;
class dose;
model bmv=dose / ss1 ss2 solution;
run;
proc nlin data=rnlín;
parameters
d=40
c=13
i50=280
b=2
;
if dose=0 then predict=d;
else predict=c+(d-c)/(1+exp(b*(logdose-log(i50))));

model bmv=predict;
run;
```

APÊNDICE 11.8. Resultado da aplicação do teste da falta de ajuste sobre as curvas de resposta às doses de metribuzin e clomazone aplicados sobre girassol cultivado em solução nutritiva. Ajuste pelo modelo log-logístico. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Curvas	MV		MS		Dano	
	F	P	F	P	F	P
metribuzin	0,54	0,59	0,33	0,72	2,7	0,09
metribuzin + 40 $\mu$ M clomazone	0,94	0,41	0,75	0,49	0,69	0,51
metribuzin + 80 $\mu$ M clomazone	0,02	0,98	0,04	0,96	0,93	0,41
clomazone	0,77	0,48	1,95	0,17	0,42	0,67
clomazone + 70 nM metribuzin	0,34	0,72	0,01	0,99	0,09	0,91
clomazone + 140 nM metribuzin	0,93	0,41	0,35	0,71	0,21	0,82

\* F= estatística F; P = probabilidade:  $P > 0,05$ : falta de ajuste não significativa; MV = massa verde; MS = massa seca.

APÊNDICE 11.9. Resumo da análise da variância e do teste de comparação de médias da massa verde e massa seca de soja e girassol, em resposta a diferentes arranjos de plantas e à aplicação dos herbicidas metribuzin e clomazone, isolados e em associação. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2001.

Fatores	MV		MS	
	F	P	F	P
Arranjos de plantas (A)	31,9	<0,001	6,2	<0,001
Tratamentos herbicidas (B)	23,6	<0,001	9,6	<0,001
Interação A*B	2,8	0,002	3,9	<0,001
R <sup>2</sup>		0,79		0,62
CV (%)		39,6		35,4
AMS 2 médias		1,83		0,78
AMS 3 médias		1,93		0,82
AMS 4 médias		2,00		0,85
AMS 5 médias		2,04		0,87
AMS 6 médias		2,08		0,89

\* F= estatística F; P = probabilidade; MV = biomassa verde; MS = biomassa seca; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação; CV = desvio padrão relativo; AMS = amplitude mínima significativa pelo teste Duncan (P<0,05).

## **12. VITA**

Nelson Diehl Kruse é filho de Eddy Diehl Kruse e Wallace Otto Kruse. Nasceu em São Sebastião do Caí, Rio Grande do Sul, em 29 de março de 1956. Coursou o ensino fundamental no Ginásio São Sebastião e o ensino médio na Escola Normal São Sebastião, ambos em São Sebastião do Caí. Em 1976 ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, graduando-se como Engenheiro Agrônomo em julho de 1980. Em 1981 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, onde obteve o grau de Mestre em Fitotecnia em 1984. Atuou como Professor Auxiliar no curso de Agronomia da Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, em Lages, Santa Catarina, entre 1983 e 1991, na área de Plantas de Lavoura. Desde 1991 é Professor Assistente do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, atuando na área de Herbologia. Em março de 1998 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRGS, e aguarda obtenção do grau de doutor em setembro de 2002.