

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Características fisiológicas da tolerância de *Digitaria nuda* a
herbicidas aplicados na cultura da cana-de-açúcar**

Renan Cantalice de Souza

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2011**

Renan Cantalice de Souza
Engenheiro Agrônomo

**Características fisiológicas da tolerância de *Digitaria nuda* a herbicidas aplicados
na cultura da cana-de-açúcar**

Orientador:
Prof. Dr. **PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Souza, Renan Cantalice de
Características fisiológicas da tolerância de *Digitaria nuda* a herbicidas aplicados
na cultura da cana-de-açúcar / Renan Cantalice de Souza. - - Piracicaba, 2011.
93 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Plantas daninhas 2. Herbicidas 3. Curvas de crescimento 4. Biologia
5. Cana-de-açúcar I. Título

CDD 633.61
S729c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

A Deus por tudo que tem feito por mim, principalmente pela
força dada em todos os momentos da minha vida.

À minha linda esposa Gleice de Oliveira Vicente Cantalice,
companheira e incentivadora em tudo o que faço e que agora
carrega em seu ventre o fruto do nosso amor.

Aos meus pais José Leonaldo de Souza e Neci Souza de
Araújo pelo apoio e amor incondicional.

A todo o restante da minha família: irmãos, sogro, sogra e
cunhados por sempre torcerem por mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia pela oportunidade da realização do curso.

Ao Professor Dr. Pedro Jacob Christoffoleti pela orientação, incentivo e confiança durante todo período do curso.

Ao Professor Dr. Valdemar Luiz Tornisielo pelos ensinamentos e ajuda nos ensaios com herbicida radiomarcado.

Ao Professor Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira pela colaboração nos estudos de biologia molecular.

Ao Dr. Renato Rodrigues Ferreira pelo incentivo e pelas valiosas contribuições para a minha tese com um todo.

Ao Dr. Joni Esrom Lima pelas contribuições na parte de bioinformática e PCR em tempo real, fundamentais para a realização dos estudos com biologia molecular.

Ao amigo Dr. Eduardo Bressan pelo auxílio com sequenciamento das amostras e sugestões para a melhoria do trabalho.

Aos amigos Eng. Agr. Msc. Hermes dos Santos Vitorino e Eng. Agr. Msc. Saulo Ítalo de Almeida Costa pela revisão do manuscrito e sugestões.

Aos técnicos e integrantes do Laboratório de Ecotoxicologia (CENA/USP) pela cooperação nos estudos com radiomarcados.

Aos técnicos e integrantes do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP) pela cooperação e colaboração durante minha estadia no laboratório.

Ao Osmair Roberto Neves técnico do laboratório de Biologia de Plantas Daninhas pela colaboração na condução dos ensaios em casa-de-vegetação.

À Luciane secretária da PPG Fitotecnia pela grande disponibilidade em ajudar.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo durante os seis primeiros meses de curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo durante o restante curso.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho e que porventura tenha me esquecido de relatar.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
Referências.....	15
2 TOLERÂNCIA DIFERENCIAL DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Digitaria</i> A HERBICIDAS RECOMENDADOS PARA A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	19
Resumo.....	19
Abstract.....	19
2.1 Introdução.....	20
2.2 Material e Métodos.....	23
2.3 Resultados e Discussão.....	25
2.4 Conclusões.....	33
Referências.....	33
3 CRESCIMENTO DAS ESPÉCIES DE CAPIM-COLCHÃO <i>Digitaria ciliaris</i> E <i>Digitaria nuda</i>	37
Resumo.....	37
Abstract.....	37
3.1 Introdução.....	38
3.2 Material e Métodos.....	40
3.3 Resultados e Discussão.....	43
3.4 Conclusões.....	53
Referências.....	53
4 ABSORÇÃO RADICULAR E TRANSLOCAÇÃO DO HERBICIDA DIURON PELAS ESPÉCIES DE CAPIM-COLCHÃO <i>Digitaria ciliaris</i> E <i>Digitaria nuda</i>	57
Resumo.....	57
Abstract.....	57
4.1 Introdução.....	58
4.2 Material e Métodos.....	60
4.3 Resultados e Discussão.....	61

4.4 Conclusões.....	65
Referências.....	65
5 ENVOLVIMENTO DE GENE DA FAMÍLIA CITOCROMO P450 MONOXIGENASE NA VIA DE DESINTOXICAÇÃO DE HERBICIDAS INIBIDORES DO FSII EM CAPIM-COLCHÃO.....	67
Resumo.....	67
Abstract.....	67
5.1 Introdução.....	68
5.2 Material e Métodos.....	71
5.2.1 Material vegetal.....	71
5.2.2 Identificação de genes relacionados a P450 e desenho dos iniciadores.....	71
5.2.3 Extração e quantificação do RNA total.....	73
5.2.4 Síntese de cDNA.....	75
5.2.5 Análise da identidade dos iniciadores por RT-PCR.....	75
5.2.6 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo.....	80
5.2.7 Cálculo da expressão relativa.....	80
5.2.8 Atividade específica da GST.....	81
5.2.9 Análise estatística.....	81
5.3 Resultados e Discussão.....	82
5.4 Conclusões.....	88
Referências.....	88
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93

RESUMO

Características fisiológicas da tolerância de *Digitaria nuda* a herbicidas aplicados na cultura da cana-de-açúcar

As espécies de capim-colchão (*Digitaria* spp.) estão entre as principais plantas daninhas que infestam os canaviais brasileiros, porém diferenciação visual dessas espécies é difícil e as diferenças fisiológicas influenciam diretamente na tolerância diferencial a herbicidas inibidores do fotossistema II (FSII), como diuron e tebutiuron e inibidores da acetolactato sintase (ALS), como imazapic e imazapir. A *D. nuda* é considerada tolerante a esses herbicidas, porém a base fisiológica dessa tolerância ainda não está esclarecida, necessitando de maiores informações a respeito dessa espécie. Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram: (i) confirmar a tolerância apresentada por *D. nuda* e verificar a existência de sinergismo entre herbicidas inibidores do FSII; (ii) caracterizar o crescimento de *D. nuda* (tolerante) e *D. ciliaris* (suscetível); (iii) verificar se a absorção radicular e/ou translocação diferencial de diuron são mecanismos que conferem tolerância a *D. nuda*; (iv) identificar e caracterizar se genes que codificam a citocromo P450 monooxigenase (P450) e glutationa-S-transferase (GST), por meio de PCR em tempo real, atuam na tolerância apresentada por *D. nuda* ao diuron. A tolerância diferencial da *D. nuda* foi confirmada em relação a espécie *D. ciliaris*, através de curvas de dose-reposta para a formulação contendo os herbicidas diuron+hexazinona, no entanto para a ametrina aplicada isoladamente não houve diferenciação de suscetibilidade entre as duas espécies. A associação de ametrina com a formulação contendo os herbicidas diuron+hexazinona provocou efeito sinérgico para o controle de *D. nuda*, porém para *D. ciliaris* o efeito foi antagônico. O crescimento das espécies de capim-colchão foi comparado por meio de análise de crescimento, sendo que *D. ciliaris* apresentou maior crescimento, em condições onde não houve limitações de nutrientes e disponibilidade hídrica, em relação a *D. nuda*, principalmente por apresentar maior área foliar, número de folhas e acúmulo de matéria seca por planta. A absorção radicular e translocação de diuron foram quantificadas a partir da aplicação de uma mistura de diuron comercial com diuron (^{14}C) ao solo. As plantas de *D. nuda* absorveram quantitativamente menos diuron em relação a *D. ciliaris*, principalmente 3 e 6 horas após a aplicação. A translocação de diuron não diferiu entre as duas espécies avaliadas. Por fim a identificação e caracterização dos genes de P450 e GST revelaram que existe envolvimento da citocromo P450 monooxigenase na metabolização do diuron em *D. nuda*, fazendo com que se torne mais tolerante a essa molécula e que parte desse fenômeno é explicado pela expressão do CYP81A6. Além disso, a GST é pouco efetiva na desintoxicação de herbicidas do grupo químico das feniluréias e triazinas.

Palavras-chave: Capim-colchão; Dose-reposta; Curvas de crescimento; Absorção de herbicidas; Metabolização de herbicidas; Herbicidas inibidores do fotossistema II

ABSTRACT

Physiological characteristics of *Digitaria nuda* tolerance to herbicides applied to the sugarcane crop

The crabgrass species (*Digitaria* spp.) are among the main weeds infesting sugarcane fields in Brazil. However the visual differentiation of these weeds is difficult, and the physiological differences affects directly the differential tolerance to herbicides that inhibit the photosystem II (PSII), as diuron and tebuthiuron, and inhibit the acetolactate enzyme (ALS), such as imazapic and imazapyr. *D. nuda* is considered more tolerant to these herbicides, but the physiological basis of this tolerance is still unclear and need further information about this specie. Therefore, the objectives of this study were: (i) confirm the tolerance shown by *D. nuda* and verify the existence of synergism between herbicides inhibitors of PSII; (ii) to characterize the growth of *D. nuda* (tolerant) and *D. ciliaris* (susceptible); (iii) to verify if the differential root uptake and/or translocation of diuron are mechanisms that confer tolerance to *D. nuda*; (iv) to identify and characterize if genes coding for cytochrome P450 monooxygenase (P450) and glutathione S-transferase (GST), using real-time PCR, act in the tolerance by *D. nuda* to diuron. The differential tolerance of *D. nuda* was confirmed in relation to *D. ciliaris*, with dose-response curves for diuron + hexazinone, however for the ametryn, applied alone, there was no differential susceptibility of the two species. The combination of ametryn to formulated mixture of diuron + hexazinone resulted in synergistic effect for the control of *D. nuda*, but for *D. ciliaris* the effect was antagonistic by the methods evaluated. The growth of crabgrass species was compared by growth analysis, and *D. ciliaris* presented the highest growth, in conditions of no limitations of nutrients and water availability, when compared to *D. nuda*, mainly due to its greater leaf area, number of leaves and dry matter accumulation per plant. The root uptake and translocation of diuron were quantified from the application of a mixture of commercial diuron and diuron (^{14}C) to soil. Plants of *D. nuda* absorbed quantitatively less diuron compared to *D. ciliaris*, especially 3 and 6 hours after application. The translocation of diuron did not differ between the two species evaluated. Finally, the identification and characterization of P450 and GST genes revealed that there is cytochrome P450 monooxygenase involved in the metabolism of diuron in *D. nuda*, causing them to become more tolerant to this molecule and that part of this phenomenon is explained by the expression of CYP81A6. In addition, the GST is less effective in the detoxification of fenilureas and triazines herbicides.

Keywords: Crabgrass; Dose response; Growth curves; Absorption of herbicides; Herbicide metabolism; Herbicide inhibitors of photosystem II

1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas presentes no agroecossistema da cana-de-açúcar estão entre os principais fatores bióticos com capacidade de interferir no desenvolvimento e na produtividade da cultura (KUVA et al., 2003). O setor sucroenergético que produziu na safra de 2010/2011 719 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (IBGE, 2011), pode perder de 20 a 80% da produtividade por conta da interferência causada pelas plantas daninhas (SIGN; KAUR, 2003; KUVA et al., 2001). Essas perdas são, principalmente na quantidade, na qualidade do produto colhido, diminuição no número de cortes viáveis e aumento dos custos em cerca de 30% para cana-soca e de 15 a 20% para cana-planta (LORENZI, 1988, 1995; PROCÓPIO et al., 2004). Tais plantas competem por água, luz, CO₂ e nutrientes, podendo também apresentar efeitos alelopáticos sobre a cultura (KUVA et al., 2003) e o controle químico é sem dúvida o método mais utilizado na cultura da cana-de-açúcar, tanto em pré-emergência como em pós-emergência. (GALON et al., 2010; CAMPOS et al., 2009; MONQUERO et al., 2009

Das espécies de plantas daninhas relatadas como frequentes nos canaviais, tem destaque o capim-colchão (*Digitaria* spp.). Porém, a diferenciação visual dessas espécies é muito difícil, sendo possível apenas com a utilização de uma lente de aumento de no mínimo 25 vezes. As quatro principais espécies de capim-colchão são: *Digitaria bicornis*, *Digitaria ciliaris*, *Digitaria horizontalis* e *Digitaria nuda*. Os elementos importantes para a classificação das espécies são as espiguetas, com base na forma de inserção, pilosidade e desenhos das glumas. No caso da *D. nuda*, caracteriza-se basicamente pela ausência da gluma I e a presença tricomas agudos e esbranquiçados no ápice. A identificação correta é fundamental para o manejo dessas plantas daninhas uma vez que ocorre tolerância diferencial a herbicidas entre as espécies de capim-colchão (DIAS et al., 2007).

Os herbicidas poupam trabalho e energia pela redução na necessidade de tratos manuais e preparo mecanizado. Além disso, podem reduzir a quantidade de fertilizantes e irrigação com a eliminação da competição (ZIMDAHL, 2007). Porém a aplicação rotineira de herbicidas gera pressão de seleção sobre a flora infestante e as duas principais formas de resposta das plantas daninhas são a mudança específica na flora, por meio da seleção de espécies de plantas daninhas mais tolerantes; ou seleção

intraespecífica de biótipos resistentes aos herbicidas (CHRISTOFFOLETI; CAETANO, 1998). A tolerância de plantas daninhas a herbicidas é resultado da capacidade inata da espécie em suportar aplicações de herbicidas, nas doses recomendadas, sem alterações marcantes em seu crescimento e/ou desenvolvimento. A suscetibilidade também é uma característica inata de uma espécie. Nesse caso, há alterações com efeitos marcantes no crescimento e desenvolvimento da planta, como resultado de sua incapacidade de suportar a ação do herbicida (CHRISTOFFOLETI, 2000).

Na prática, produtores têm relatado casos de falhas de controle em áreas de cana-de-açúcar, que possivelmente estão relacionadas com mudanças da flora infestante em função da seleção de algumas espécies de capim-colchão tolerantes aos herbicidas anteriormente recomendados para o seu controle. Das espécies de capim-colchão, existem relatos que *Digitaria nuda* foi selecionada em áreas de cultivo comercial de cana-de-açúcar, principalmente por sua tolerância a aplicações consecutivas de herbicidas inibidores do fotossistema II (FSII) como o diuron e tebutiuron e herbicidas inibidores da ALS (imazapic e imazapyr). Porém necessita-se de mais trabalhos para tentar elucidar os mecanismos de tolerância dessa planta daninha e aumentar os conhecimentos sobre a biologia dessa espécie (DIAS, 2004). A Weed Science Society of America (WSSA), durante encontro nos Estados Unidos, ressaltou que o efetivo manejo das plantas daninhas através de um sistema de manejo integrado deve estar baseado em conhecimentos sólidos sobre a biologia destas plantas (BHOWMIK, 1997). Desta forma, o manejo das espécies de *Digitaria* presentes nas áreas agrícolas deve ser realizado com forte embasamento nos conhecimentos de biologia e fisiologia destas plantas, conhecimentos estes que ainda não foram adequadamente explorados pelas pesquisas.

Em relação à suscetibilidade de espécies a herbicidas, o método mais adequado para investigar os níveis de suscetibilidade é através de curvas de dose-resposta (CARVALHO et al., 2005; CHRISTOFFOLETI et al., 2006). A constatação da tolerância por *D. nuda* ao diuron foi realizada através desse método (DIAS et al., 2004). Porém, torna-se necessário investigar o comportamento dessa espécie a outras moléculas que inibem do FSII aplicados na cultura canavieira, além da associação desses tipos de herbicidas. A análise de crescimento é uma ferramenta simples, que é capaz de revelar

como diversos processos fisiológicos interferem no crescimento, sendo útil no estudo de variações de plantas geneticamente diferentes (BENICASSA, 1988). Assim, com o auxílio dessa ferramenta, é possível estabelecer diferenças entre as espécies do gênero *Digitaria*, que podem fornecer subsídios importantes para compreensão da dinâmica dessas nos canaviais.

No intuito de investigar a tolerância e/ou resistência de plantas a herbicidas existe quatro mecanismos gerais que podem explicar esse fato: redução da concentração do herbicida no local de ação; absorção foliar e/ou translocação reduzida; metabolização e/ou desintoxicação do herbicida em substâncias menos tóxicas e por fim a perda da afinidade do herbicida pelo local de ação (SHERMAN et al., 1996). Os estudos para quantificar o conteúdo de herbicida absorvido e/ou translocados por plantas são dirigidos com uso de moléculas marcadas com ^{14}C (PRADO et al., 1990; DIAS, 2004). Em relação ao metabolismo de herbicidas, tem-se relacionado o envolvimento das enzimas GST (glutathione-s-transferase) e citocromo P450 monooxigenases, na detoxificação xenobiótica das plantas em geral (CARVALHO et al., 2009).

Diante do exposto, os objetivos do trabalho desenvolvido foi primeiramente confirmar a suscetibilidade diferencial *D. nuda* e verificar a existência de sinergismo de moléculas que inibem o fluxo de elétrons no FSII para o controle dessa espécie. O segundo objetivo foi comparar o crescimento e desenvolvimento de *D. nuda* (tolerante) e *D. ciliaris* (suscetível). O terceiro foi investigar se a absorção radicular e/ou a translocação diferencial são mecanismos de tolerância apresentado por *D. nuda*. E por fim verificar se a expressão de genes relacionados com a desintoxicação xenobióticas, tem relação com grau de tolerância apresentada por essas espécies.

Referências

BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas, noções básicas.**

Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42 p.

BHOWMIK, P.C. Weed biology: importance to weed management. **Weed Science**, Champaign, v. 45, n. 3, p. 349-356, 1997.

CAMPOS, L.H.F.; FRANCISCO, M.O.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Suscetibilidade de *Ipomoea quamoclit*, *I. triloba* e *Merremia cissoides* aos herbicidas sulfentrazone e amicarbazone. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 831-840, 2009.

CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; FERREIRA, R.R.; FIGUEIRA, A.V.O.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Herbicide selectivity by differential metabolism: considerations for reducing crop damages. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 1, p. 136-142, 2009.

CARVALHO, S.J.P.; LOMBARDI, B.P.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MEDEIROS, D. Curvas de dose-resposta para avaliação do controle de fluxos de emergência de plantas daninhas pelo herbicida imazapic. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 3, p. 535-542, 2005.

CHRISTOFFOLETI, P.J. **Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase e acetil coenzima A carboxilase**. 2000. 211 p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; CAETANO, R.S.X. Soil seed banks. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, p. 74-78, 1998.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; BORGES, A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; MONQUERO, P.A. Carfentrazone-ethyl aplicado em pós-emergência para o controle de *Ipomoea* spp. e *Commelina benghalensis* na cultura da cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 83-90, 2006.

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

DIAS, N.M.P. **Tolerância de espécies de capim-colchão (*Digitaria* spp) a herbicidas na cultura de cana-de-açúcar**. 2004. 118 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GALON, L.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, E.A.; SILVA, A.A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A.F.; REIS, M.R.; ASPIAZÚ, I.; FIALHO, C.M.T.; BARBOSA, M.H.P.; TIRONI, S.P. Tolerância de novos genótipos de cana-de-açúcar a herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 329-338, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2011. v. 24, n. 8, p. 1-82.

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

_____. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana de açúcar. III. Capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 1, p. 37-44, 2003.

LORENZI, H. Plantas daninhas e seu controle na cultura da cana-de-açúcar. SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 4., 1988, Piracicaba. **Anais...** São Paulo: COPERSUCAR, 1988. p. 281-301.

_____. Plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar: plantas daninhas na lavoura do nordeste brasileiro. In: ENCONTRO TÉCNICO GOAL, CANA-DE-AÇÚCAR, 4., 1995, Recife. **Anais...** Recife: Dow Agrosiences, 1995. p. 10-20.

MONQUERO, P.A.; BINHA, D.P.; INÁCIO, E.M.; SILVA, P.V.; AMARAL, L.R.; SILVA, A.C. Eficácia de herbicidas aplicados em diferentes épocas sobre *B. pilosa* e *I. quamoclit* em área de cana-de-açúcar colhida mecanicamente. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 563-570, 2009.

PRADO, P.; SCALLA, R.; GAILLARDON, P. Differential toxicity of simazine and diuron to *Torilis arvensis* and *Lolium rigidum*. **Weed Research**, Oxford, v. 30, p. 213-221, 1990.

PROCÓPIO, S.O.; SILVA, A.A.; VARGAS, L. Manejo e controle de plantas daninhas em cana-de-açúcar. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.S. (Ed.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 397-452.

SHERMAN, T.D.; VAUGHN, K.C.; DUKE, S.O. Mechanism of action and resistance to herbicides. In: DUKE, S.O. (Ed.). **Herbicide resistant crops**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 14-28.

SINGH, A.; KAUR, C. Evaluation of herbicides for the control of weeds in spring planted sugarcane. **Sugar Tech**, New Delhi, v. 5, n. 4, p. 317-318, 2003.

ZIMDAHL, R.L. **Fundamentals of weed science**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2007. 666 p.

2 TOLERÂNCIA DIFERENCIAL DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Digitaria* A HERBICIDAS RECOMENDADOS PARA A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

O controle químico de capim-colchão (*Digitaria* spp.) pode ser insatisfatório dependendo da composição florística das espécies presentes na área. Sabe-se que existe falha no controle de *Digitaria nuda* em locais onde existiram aplicações de herbicidas inibidores do fotossistema II durante vários anos seguidos, sendo necessário entender melhor como funciona essa tolerância. O objetivo do presente estudo foi desenvolver curvas de dose-resposta para *D. nuda* (tolerante) e *D. ciliaris* (suscetível), com herbicidas recomendados para a cultura da cana-de-açúcar aplicados isoladamente ou em associações. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação com aplicação dos herbicidas, em pré-emergência, diuron+hexazinona, ametrina e associação desses dois em doses crescentes, de: 0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 % da dose recomendada, para a cultura da cana-de-açúcar, dos herbicidas diuron+hexazinona (936+264 g i.a ha⁻¹), ametrina (2500 g i.a ha⁻¹) e a associação dos dois herbicidas nas mesmas proporções. Pode-se concluir que *D. nuda* é tolerante ao herbicida diuron+ametrina. Aplicação de ametrina de forma isolada gerou níveis de controle semelhante para as duas espécies estudadas. A associação de ametrina com o herbicida diuron+hexazinona provocou efeito sinérgico para o controle de *D. nuda*, porém para *D. ciliaris* o efeito foi antagônico pelos métodos avaliados.

Palavras-chave: *Digitaria nuda*; *Digitaria ciliaris*; Curvas dose-resposta; Suscetibilidade diferencial

Abstract

The chemical control of crabgrass (*Digitaria* spp.) can be poor depending on the species composition in the area. It is known that there is a lack of control of *Digitaria nuda* in places where repetitive applications of photosystem II inhibitors herbicides has been done for long-time, being necessary to better understand how this tolerance works. The aim of this study was to develop dose-response curves for *D. nuda* (tolerant) and *D. ciliaris* (susceptible), with recommended herbicides for sugarcane crop used alone or in associations. The experiment was carried out in a greenhouse with pre-emergence application of diuron + hexazinone, ametryn and association of both, in increasing doses of 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400% of the label for sugarcane of the herbicides diuron + hexazinone (936 +264 g ai ha⁻¹), ametryn (2500 g ai ha⁻¹) and the combination of the two herbicides in the same proportions. It could be concluded that *D. nuda* is tolerant to diuron + hexazinone herbicide. Application of ametryn alone produced similar levels of control in both species. The association of ametryn with the herbicide diuron + hexazinone caused synergistic effect for the control of *D. nuda*, but for *D. ciliaris* the effect was antagonistic.

Keywords: *Digitaria nuda*; *Digitaria ciliaris*; Dose-response curves; Differential susceptibility

2.1 Introdução

O conjunto de plantas que infestam áreas agropecuárias e de outros setores de interesse humano (conceituadas como daninhas) são plantas com características pioneiras em uma sucessão ecológica, e por conta disso, possuem grande agressividade com elevada capacidade de produção de diásporos e rápido crescimento vegetativo e florescimento (PITELLI, 1987). Então essas plantas causam danos diretos nas culturas como a competição por nutrientes minerais essenciais, a luz, a água e o espaço, que podem reduzir a produtividade no caso da cana-de-açúcar em até 82% (KUYA et al., 2001). Também podem causar danos indiretos quando as plantas daninhas atuam como hospedeiras alternativas de pragas, doenças, nematóides, plantas parasitas e quando dificultam a colheita. Por isso, a adoção de medidas que interfiram no crescimento e controle do desenvolvimento de plantas daninhas deve ocorrer dentro de um período crítico para que não ocorram danos à cultura e nem prejudiquem o ambiente (SILVA et al., 2007). Entre os métodos existentes, o controle químico de plantas daninhas é sem dúvida o mais utilizado na cultura da cana-de-açúcar, tanto em pré-emergência como em pós-emergência. (GALON et al., 2010; CAMPOS et al., 2009; MONQUERO et al., 2009). Além disso, os herbicidas proporcionam diversos benefícios como redução na necessidade de tratos manuais e preparo mecanizado. E também podem reduzir a quantidade de fertilizantes e irrigação com a eliminação da competição (ZIMDAHL, 2007).

Entre as principais espécies de plantas daninhas que infestam canaviais estão as que compõem um grupo chamado comumente de capim-colchão (DIAS et al., 2007). As espécies de capim-colchão são altamente agressivas como infestantes, relatadas como problema em 60 países, infestando mais de 30 culturas de importância econômica. No Brasil, constituem problema sério em muitas culturas anuais e semi-perenes, como a cana-de-açúcar. Estas são particularmente hábeis no processo de competição, causando danos às culturas e viveiros. Também apresentam vantagens em relação às culturas em condição de seca, além de apresentarem efeitos alelopáticos

sobre várias plantas cultivadas (KISSMANN, 1997). No Estado de São Paulo o gênero *Digitaria*, a qual pertence às espécies de capim-colchão, tem 14 espécies descritas em que a diferenciação visual é muito difícil por conta da semelhança morfológica entre elas sendo apenas possível a identificação botânica com lente de aumento de no mínimo 25 vezes com base nas características morfológicas das espiguetas. *D. horizontalis*, *D. nuda*, *D. ciliaris* e *D. bicornis* são encontradas com maior frequência em canaviais (DIAS et al., 2009). A espécie *D. nuda* ocorre em regiões tropicais de todos os continentes, ocorrendo com maior frequência na África, onde foi originalmente descrita. É uma planta anual, decumbente, 14-70cm de altura. Suas espiguetas em número de dois por nó, medem 2-2,4mm de comprimento, 0,6-0,7mm de largura, lanceoladas; gluma inferior ausente; gluma superior 0,9-1,2mm de comprimento, 0,3-0,5mm de largura, até metade do comprimento do lema inferior, aguda, pilosa, tricomas agudos, esbranquiçados, esparsos, nas margens e entre as nervuras, ultrapassando o ápice da gluma; lema inferior 2-2,1mm de comprimento 0,6-0,7mm de largura, agudo, piloso nas margens e entre as nervuras laterais, tricomas agudos, densos, ultrapassando o ápice do lema em 0,2-0,4mm; pálea inferior ausente; antécio superior 1,8-2,2mm de comprimento, 0,4-0,6mm de largura, com flor bissexuada, lanceolado, agudo, com papilas em fileiras longitudinais, castanho claro na maturidade. Anteras 0,3-0,4mm de comprimento. Cariopse 1,2mm de comprimento, 0,4-0,6mm de largura, lanceolada, zona do embrião metade do comprimento da cariopse. Pelas dimensões das espiguetas assemelha-se com *D. horizontalis* (CANTO-DOROW, 2001). A espécie *D. ciliaris* também é anual com reprodução sexuada apresentando número de cromossomos $2n=27$. É mencionada como originária da ilha de Taiwan (KISSMANN, 1997). As espiguetas em número de dois por nó, medem (2,2)2,5-3,2(3,4)mm de comprimento, 0,7-0,9(1,1)mm de largura, lanceoladas; gluma inferior presente, 0,3-0,4(0,6)mm de comprimento, aguda; gluma superior 1,6-2,1mm comprimento, 0,3-0,5mm de largura, 1/2-3,4 do comprimento do lema inferior, aguda, pilosa, tricomas agudos, esbranquiçados, densos; lema inferior (2,2)2,5-3,2(3,4)mm de comprimento 0,7-0,9(1,1)mm de largura, agudo, piloso nas margens e entre as nervuras laterais, tricomas agudos, densos ou esparsos, não ultrapassando o ápice do lema; pálea inferior ausente; antécio superior (2,1)2,4-3,2(3,3)mm de comprimento, 0,5-0,8mm de largura,

com flor bissexuada, lanceolado, agudo, com papilas em fileiras longitudinais, castanho claro na maturidade. Anteras 0,7-1,1mm de comprimento. Cariopse medindo 1,7-2,1mm de comprimento, 0,6-0,8 mm de largura, zona do embrião menor do que 1/2 do comprimento da cariopse (CANTO-DOROW, 2001).

Dentro das espécies de capim-colchão, *Digitaria nuda* tem sido apontada como tolerante aos herbicidas diuron, diuron+hexazinona, tebutiuron (inibidores do transporte de elétrons no FSII) e imazapic (inibidor da ALS). Porém em outras moléculas com mesmo mecanismo de ação como a ametrina (inibidora do transporte de elétrons no FSII), a tolerância não foi observada (DIAS et al., 2003, 2005, 2007). A tolerância de plantas daninhas a herbicidas é resultado da capacidade inata da espécie em suportar aplicações de herbicidas, nas doses recomendadas, sem alterações marcantes em seu crescimento e/ou desenvolvimento. A suscetibilidade também é uma característica inata de uma espécie. Nesse caso, há alterações com efeitos marcantes no crescimento e desenvolvimento da planta, como resultado de sua incapacidade de suportar a ação do herbicida (CHRISTOFFOLETI, 2000). Porém uma única aplicação pode não ser eficaz no controle de espécies daninhas que apresentam tolerância diferencial dentro do mesmo gênero, podendo ser necessária aplicação de mais de uma molécula simultaneamente para obtenção de níveis de controle satisfatórios. Na maioria das vezes, as misturas de herbicidas são utilizadas com o objetivo de aumentar o espectro de controle das plantas daninhas. Além dessa vantagem, o uso de associações de moléculas permite reduzir as doses, o que implica menor risco de fitotoxicidade da cultura, menor efeito residual no solo e redução nos custos de controle. Também, nas misturas, um herbicida pode melhorar a ação do outro, ou seja, pode ocorrer efeito sinérgico ou complementar da mistura, resultando em maior eficiência de controle, mesmo sob variações das condições climáticas (RONCHI et al., 2002).

As curvas de dose-reposta têm sido empregadas para a detecção de resistência em biótipos de plantas daninhas. Além de servirem também para estudos de associações de herbicidas e na influencia de fatores ambientais em seu desempenho. Assim as curvas descrevem o comportamento biológico das plantas daninhas em relação a uma molécula isolada ou em associação, por meio de doses crescentes de forma a obter intervalos equidistantes em escala logarítmica (SEEFELDT et al., 1995;

KRUSE et al., 2006). O objetivo do presente trabalho foi construir curvas de dose-reposta com herbicidas recomendados para a cultura da cana-de-açúcar isolados ou em misturas e verificar os possíveis efeitos das associações na tolerância diferencial de duas espécies de capim-colchão.

2.2 Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido em casa-de-vegetação pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da ESALQ – USP, no município de Piracicaba, 22° 42' 29.98" S, 47° 37' 42.95" W e 546 m de altitude. As unidades experimentais foram vasos com capacidade de 2,0 L preenchidos com solo de textura média (20% argila; 77% areia; 3% silte, 48 g dm⁻³ MO), adubados com 5 gramas de NPK na formulação 10-10-10 por vaso. Ambas as espécies foram semeadas diretamente nos vasos, sendo irrigados diariamente através de um sistema de irrigação automático, para que não ocorresse deficiência hídrica.

O delineamento utilizado, em cada experimento (herbicida), foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, com quatro repetições. Os fatores foram duas espécies de capim-colchão (*D. ciliaris* e *D. nuda*) e oito doses dos herbicidas. As doses foram: 0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 % da dose recomendada, para a cultura da cana-de-açúcar, dos herbicidas diuron+hexazinona (936 + 264 g i.a. ha⁻¹), ametrina (2500 g i.a. ha⁻¹) e a associação dos dois herbicidas nas mesmas proporções.

A aplicação dos tratamentos herbicidas foi realizada em pré-emergência, após a semeadura das plantas daninhas, utilizando-se um pulverizador costal pressurizado a CO₂ e equipado com barras contendo duas pontas de pulverização de jato plano Teejet 80.02VS, à 200 KPa, para proporcionar um volume de calda correspondente a 200 Lha⁻¹.

Após a aplicação dos tratamentos foi realizada avaliação visual de controle aos 15, 30, 45 e 60 dias (DAT), onde 0 representava ausência total de sintomas e 100% morte da planta (VELINI, 1995) e a coleta das plantas para pesagem da massa seca. Com os dados de massa seca foi calculado o percentual de redução em relação a dose 0 do herbicida. Optou-se pela apresentação das curvas geradas apenas aos 60 DAT.

Os dados de controle e massa seca dos experimentos foram ajustados ao modelo de regressão não-linear do tipo logístico proposto por Streibig et al. (1988) (eq. 2.1):

$$y = \frac{a}{\left[1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c\right]} \quad (2.1)$$

em que: y = porcentagem de controle; x = dose do herbicida; e a , b e c = parâmetros da curva, de modo que a é a diferença entre o ponto máximo e mínimo da curva, b é a dose que proporciona a porcentagem de 50% da resposta da variável e c é a declividade da curva.

Para comparação da suscetibilidade diferencial entre as espécies e definição de doses ótimas de controle foram calculadas as porcentagens de controle de 50%, 80% 90% e 99%, cujos valores foram obtidos a partir das equações geradas das curvas de dose resposta e representa a dose dos herbicidas, em gramas de ingrediente ativo por hectare, para controles de 50%, 80% 95% e 99%, respectivamente (MOREIRA et al., 2007; CARVALHO et al., 2005, 2006; CHRISTOFFOLETI et al., 2006; CHRISTOFFOLETI, 2002).

Por fim, foi também calculado o índice de combinação das associações de herbicidas (I_{Comb}) (RAMAKRISHNAN; JUSKO, 2001; KRUSE et al., 2006), pela eq. (2.2):

$$I_{Comb} = \frac{I_{50ab1}}{I_{50a}} + \frac{I_{50ab2}}{I_{50b}} \quad (2.2)$$

em que: I_{50ab1} e I_{50ab2} são as doses dos produtos em associação que produzem 50% da resposta da variável e I_{50a} e I_{50b} são doses dos produtos aplicados isoladamente que produzem 50% da resposta variável.

2.3 Resultados e Discussão

O resultado da análise de variância indicou que as espécies de capim-colchão diferiram em relação ao herbicida diuron+hexazinona e a mistura desse com a ametrina, aplicados em pré-emergência das plantas daninhas. Porém a ametrina aplicada isoladamente não diferiu para as duas espécies (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Resumo do quadro da análise da variância para o controle e a massa seca residual das espécies de capim-colchão submetidas a herbicidas recomendados para a cultura da cana-de-açúcar

Variável	Fonte de Variação	F	P
Diuron+hexazinona			
Controle aos 60 DAA¹	Doses (D)	77,142	<0,001
	Espécies (E)	165,678	<0,001
	Interação (D*E)	10,532	<0,001
Massa Seca	Doses (D)	23,888	<0,001
	Espécies (E)	30,931	<0,001
	Interação (D*E)	2,074	0,073
Ametrina			
Controle aos 60 DAA	Doses (D)	18,794	<0,001
	Espécies (E)	0,002	0,964
	Interação (D*E)	0,290	0,953
Massa Seca	Doses (D)	15,446	<0,001
	Espécies (E)	0,445	0,510
	Interação (D*E)	0,567	0,777
Diuron+hexazinona+ametrina			
Controle aos 60 DAA	Doses (D)	67,361	<0,001
	Espécies (E)	10,848	0,002
	Interação (D*E)	10,311	<0,001
Massa Seca	Doses (D)	846,970	<0,001
	Espécies (E)	529,656	<0,001
	Interação (D*E)	311,633	<0,001

¹Dias após aplicação

As curvas explicam melhor os padrões apresentados por *D. nuda* e *D. ciliaris*. A maior inclinação da curva indica uma maior amplitude entre as doses necessárias para o controle das plantas daninhas avaliadas (CHRISTOFFOLETI, 2002). Para o herbicida diuron+hexazinona, o controle máximo atingido para *D. nuda* foi próximo aos 56% mesmo com doses acima da dose recomendada comercialmente. Enquanto que *D. ciliaris* foi controlada em 100% com doses próximas a recomendada comercialmente (Figura 2.1). Esse fato demonstra assim maior tolerância apresentada por *D. nuda* a alguns herbicidas inibidores do fotossistema II (FSII) e corroboram com Dias et al. (2003, 2007). O mesmo comportamento foi apresentado para os dados de matéria seca das plantas (Figura 2.2).

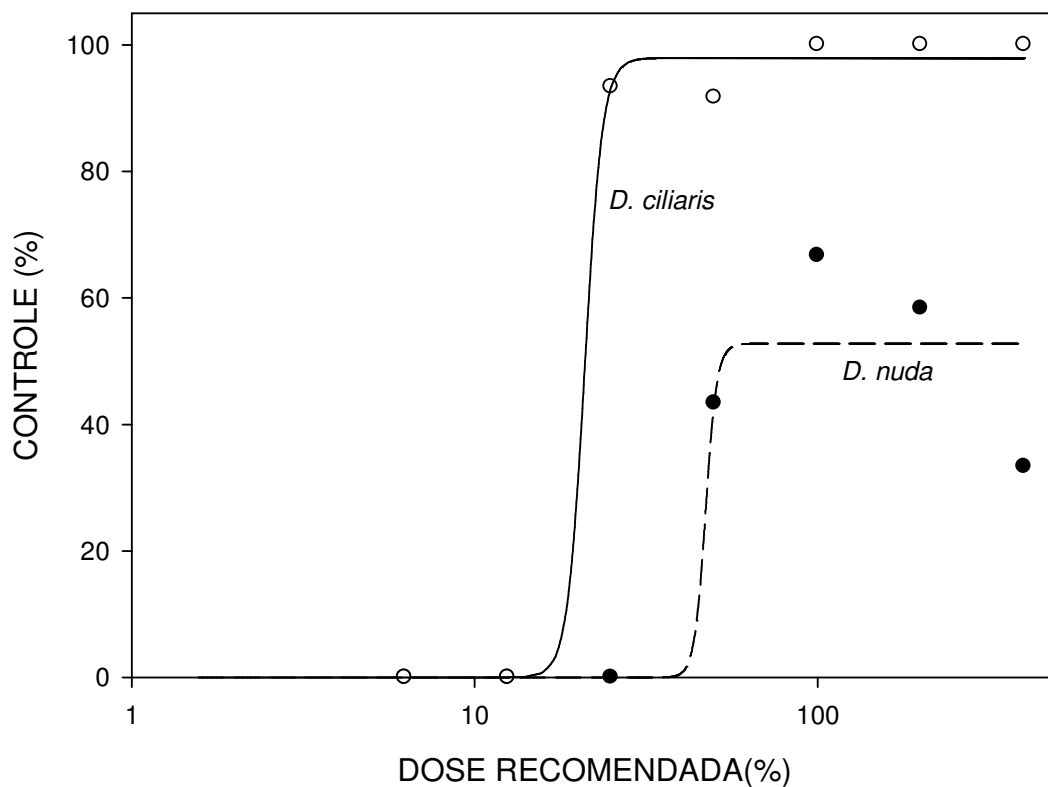


Figura 2.1 - Percentual de controle de espécies de capim-colchão 60 dias após a aplicação de diuron+hexazinone em doses crescentes

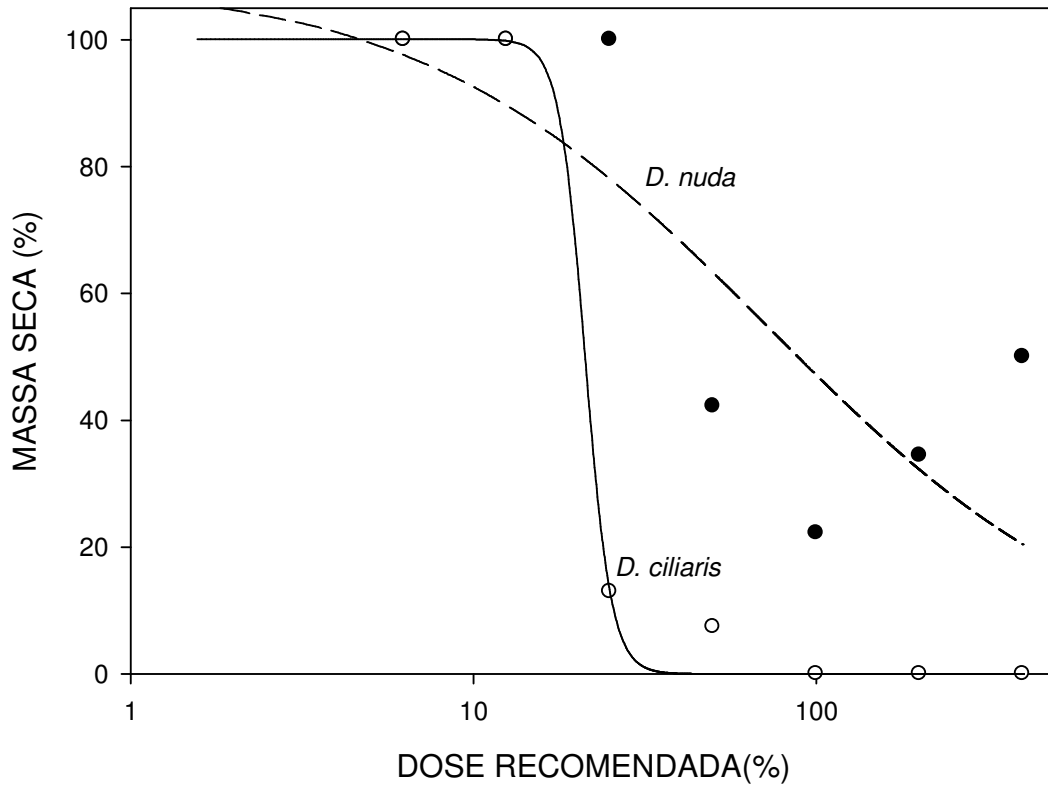


Figura 2.2 - Massa seca percentual de espécies de capim-colchão 60 dias após a aplicação de diuron+hexazinone em doses crescentes

A ametrina controlou as espécies de capim-colchão de forma semelhante, com valores próximos aos 100% com doses próximas a recomendada comercialmente (Figura 2.3). Comportamento semelhante foi observado para o percentual de matéria seca das espécies (Figura 2.4). Essa molécula pode ser uma alternativa para o controle de *D. nuda*, além de também controlar *D. ciliaris*, fazendo com que o mesmo possa ser empregado para o controle eficiente de capim-colchão. Esses resultados também confirmam os resultados apresentados por Dias et al. (2005), que testou a eficácia agrônômica de alguns herbicidas no controle de espécies do gênero *Digitaria*.

Apesar de todos herbicidas testados apresentarem o mesmo mecanismo de ação quando em contato com as plantas, atuando pelo bloqueio da passagem de elétrons entre o FSII e FSI, a ligação dos diferentes herbicidas inibidores do FSII no

sítio específico de ação é diferente fazendo com que uns proporcionem controle e outros não (CHRISTOFFOLETI et al., 2001)

Basicamente os mecanismos que as plantas utilizam para tolerar e/ou resistir à uma molécula são os seguintes: menor absorção e/ou translocação, maior metabolização do herbicida em substâncias menos fitotóxicas, compartimentalização da molécula, falta de afinidade do herbicida pelo sítio de ação específico e superprodução da enzima-alvo (HOLT et al., 1993).

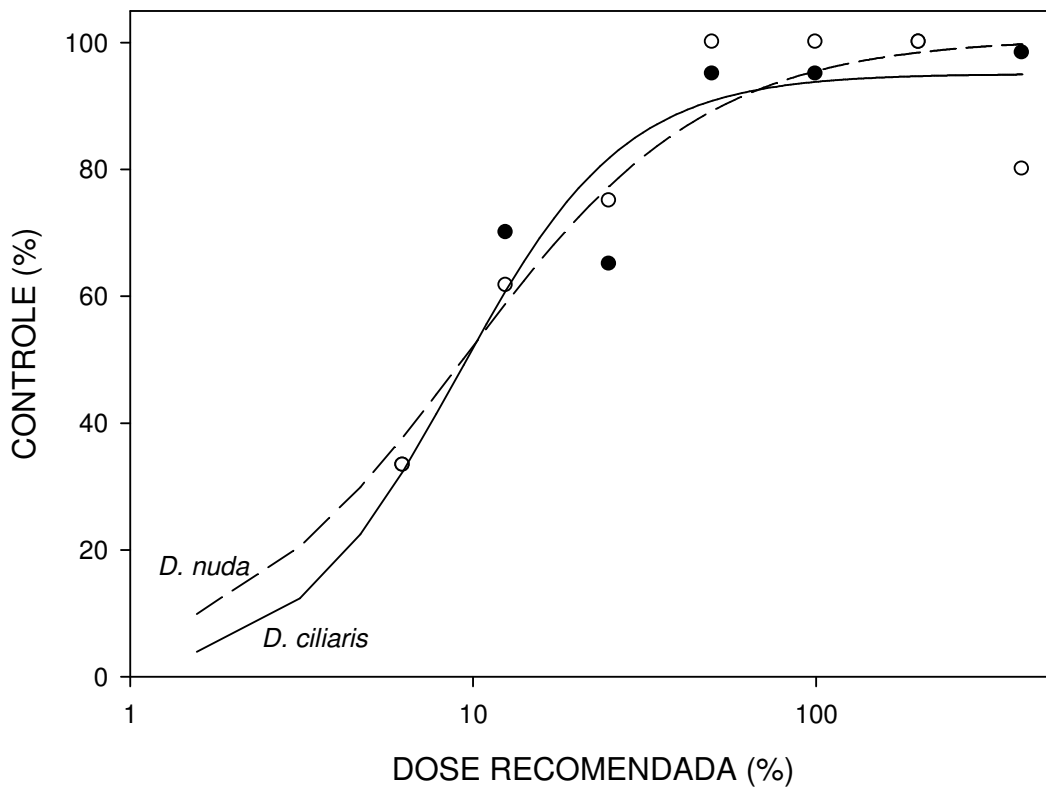


Figura 2.3 - Percentual de controle de espécies de capim-colchão 60 dias após a aplicação de ametrina em doses crescentes

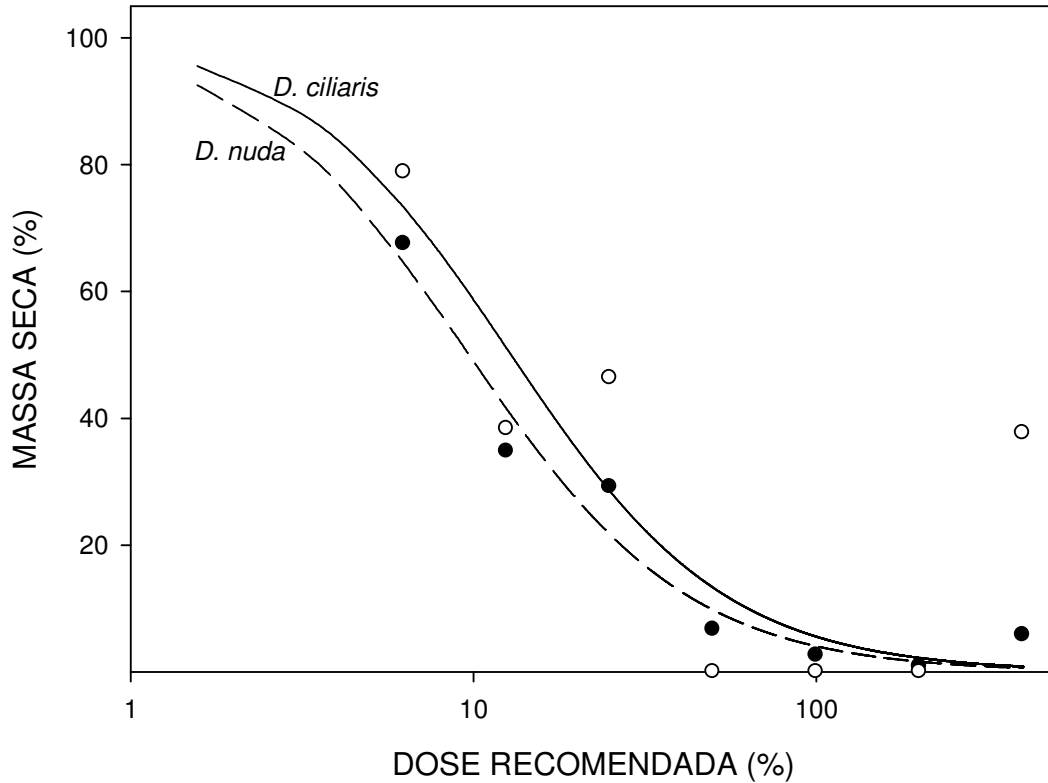


Figura 2.4 - Massa seca percentual de espécies de capim-colchão 60 dias após a aplicação de ametrina em doses crescentes

A mistura dos herbicidas proporcionou resultados diferentes para as espécies de capim-colchão. Em doses baixas a mistura promoveu maiores níveis de controle para *D. nuda* em relação a *D. ciliaris* (Figura 2.5). O resultado apresentado pela variável de massa seca das plantas também explica o comportamento distinto das espécies de capim-colchão em doses baixas das misturas estudadas (Figura 2.6). Porém em doses mais altas as espécies se comportam de maneira semelhante, atingindo controle próximo a 100%.

Esse fato indica que em baixas doses da mistura de diuron+hexazinona possivelmente não foi absorvido pelas plantas de *D. nuda* e a ametrina foi responsável pelo controle da espécie. Já em *D. ciliaris* a absorção do diuron+hexazinona causou efeito antagônico no controle da espécie, fazendo que em baixas doses o controle seja ineficiente.

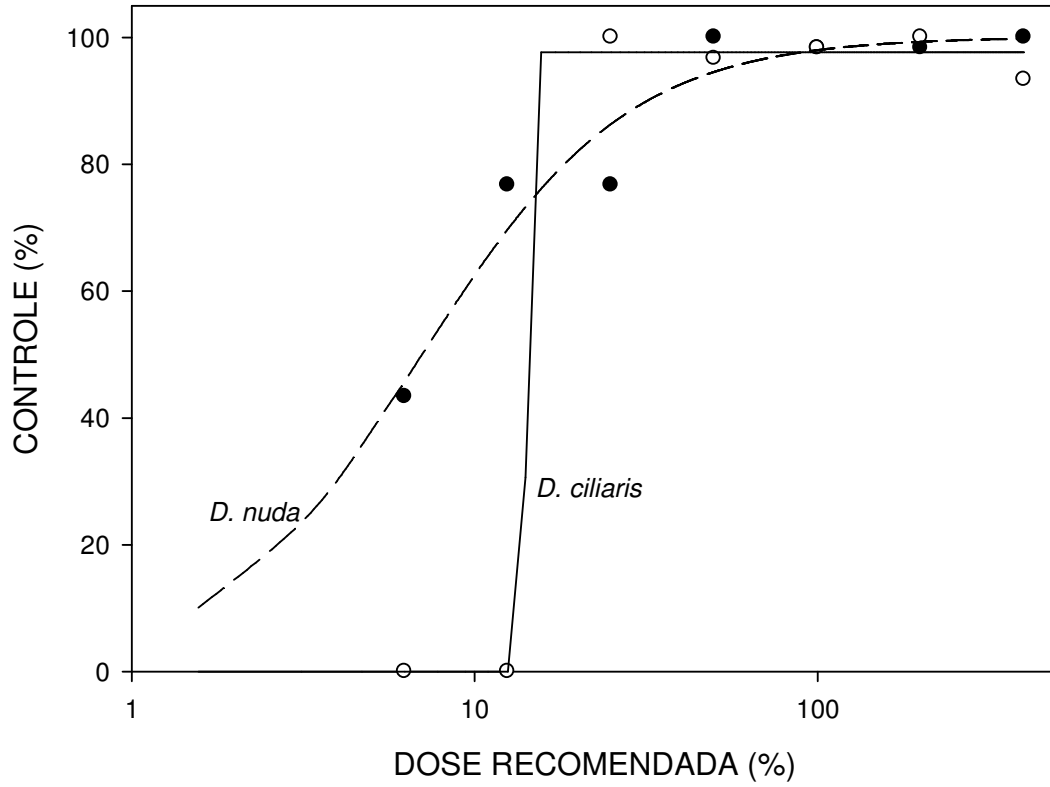


Figura 2.5 - Percentual de controle de espécies de capim-colchão 60 dias após a aplicação de diuron+hexazinone+ametrina em doses crescentes

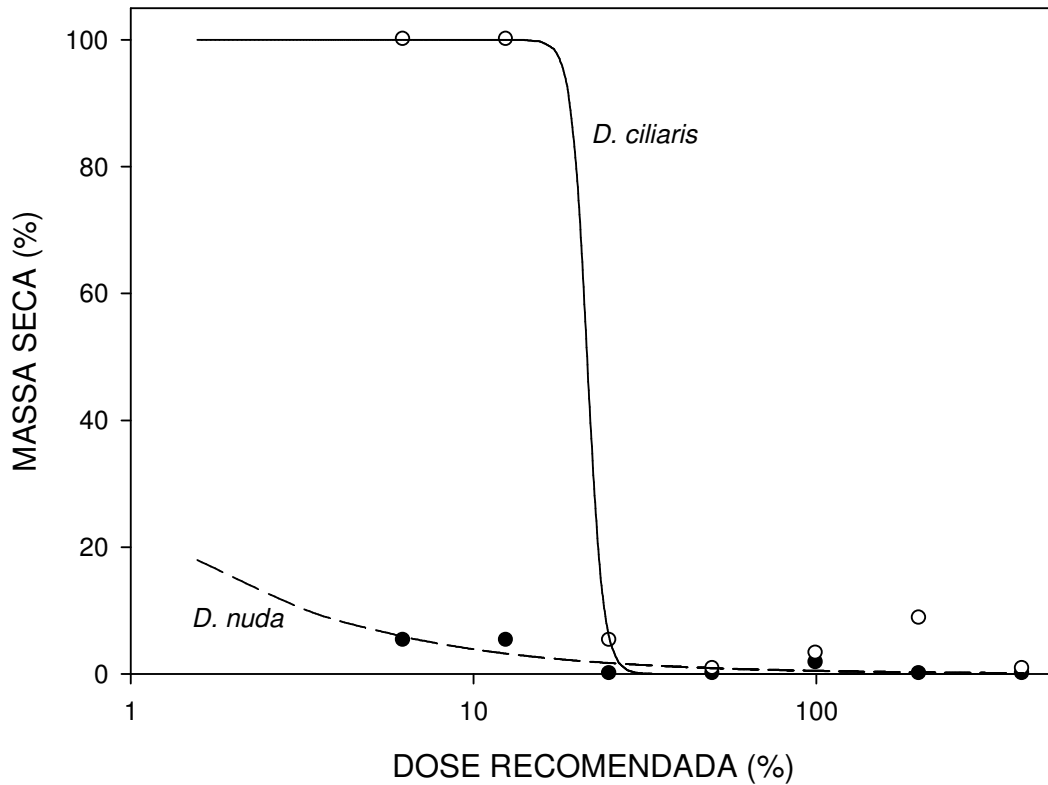


Figura 2.6 - Massa seca percentual de espécies de capim-colchão 60 dias após a aplicação de diuron+hexazinone+ametrina em doses crescentes

Os níveis de controle mais importantes para compreensão das variações de dose descritas em forma de curva estão dispostos na tabela 2.2. Esses parâmetros já foram confeccionados por Christoffoleti et al. (2006), que observaram na curva encontrada em seu trabalho, dados de controle de 50% para ordenar as espécies de corda-de-viola quanto a suscetibilidade ao carfentrazone-ethyl. Para geração de um resultado voltado ao uso prático a campo, selecionou-se o nível de controle de 80% (FRANS; CROWLEY, 1986), para confecção da classificação por suscetibilidade, observando-se que a espécie que apresentou menor suscetibilidade, no presente estudo, aos herbicidas isolados ou em misturas foi *D. nuda*.

Tabela 2.2 - Quantidade de ingrediente ativo (g ha^{-1}) necessária para obtenção das médias de controle de 50%, 80%, 90% e 99% para espécies de capim-colchão aos 60 dias após a aplicação, obtida pela equação que gera a curva correspondente a cada espécie

Diuron+hexazinona		
% Controle	<i>D. nuda</i>	<i>D. ciliaris</i>
50	493,05+139,07	196,49+55,42
80	IDM	214,02+60,36
90	IDM	226,10+63,77
99	IDM	IDM
Ametrina		
% Controle	<i>D. nuda</i>	<i>D. ciliaris</i>
50	236,25	238,96
80	729,21	573,01
90	1409,87	1124,72
99	9904,66	IDM
Diuron+hexazinona+ametrina		
% Controle	<i>D. nuda</i>	<i>D. ciliaris</i>
50	65,89+18,59+176	132,59+37,40+354,15
80	171,42+48,35+457,85	134,27+37,87+358,62
90	299,88+84,58+800,96	135,37+38,18+361,56
99	1567,29+442,06+4186,13	IDM

¹ - impossível determinar pelo método.

O cálculo do índice de combinação das associações de herbicidas (IComb) variou para as duas espécies de capim-colchão, no qual a espécie *D. nuda* demonstrou valor do índice de 0,88, enquanto que *D. ciliaris* apresentou 2,16. Os valores IComb igual a 1,0 indicam que a interação entre os dois herbicidas é aditiva; valores de IComb maiores que 1,0 indicam interação antagonista entre herbicidas; e valores menores que 1,0 indicam efeito sinérgico dos herbicidas (RAMAKRISHNAN; JUSKO, 2001; KRUSE et al., 2006). Dessa forma, o presente estudo aponta efeito antagônico para *D. ciliaris* com a adição de ametrina ao produto formulado de diuron+hexazinona. Já para *D. nuda* o efeito da adição de ametrina foi sinérgico. O

efeito sinérgico, ou seja, quando o efeito combinado de dois herbicidas é maior que o esperado pela soma dos efeitos desses herbicidas quando aplicados isoladamente, pode ser resultado do aumento da absorção radicular, foliar, e da translocação desses herbicidas, da inibição do metabolismo destes na planta e de interações dos mecanismos de ação dos herbicidas envolvidos (RONCHI et al., 2002).

Sugere-se mais estudos de associações de moléculas que inibem o FSII, para o controle das espécies de capim-colchão. Princiamente visando o alcance de um maior número possível de espécies de *Digitaria* e redução da quantidade de ingrediente ativo.

2.4 Conclusões

A *D. nuda* apresenta menor suscetibilidade aos herbicidas formulados diuron + hexazinone, quando comparada com a *D. ciliaris*, sendo que os níveis de controle obtidos em doses recomendada desta formulação é insatisfatório (<80% aos 60 DAA). A ametrina aplicada isoladamente controla de forma semelhante as duas espécies de capim-colchão. A adição de ametrina ao herbicida diuron + hexazinona proporciona sinergismo para o controle de *D. nuda*, porém antagonismo para a espécie *D. ciliaris*

Referências

- CAMPOS, L.H.F.; FRANCISCO, M.O.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Suscetibilidade de *Ipomoea quamoclit*, *I. triloba* e *Merremia cissoides* aos herbicidas sulfentrazone e amicarbazone. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 831-840, 2009.
- CANTO-DOROW, T.S. **O gênero *Digitaria* Haller (Poaceae - Panicoideae - Poniceae) no Brasil**. 2001. 386 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- CARVALHO, S.J.P.; BUISSA, J.A.R.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Suscetibilidade diferencial de plantas daninhas do gênero *Amaranthus* aos herbicidas trifloxysulfuron-sodium e chlorimuron-ethyl. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 541-548, 2006.

CARVALHO, S.J.P.; LOMBARDI, B.P.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MEDEIROS, D. Curvas de dose-resposta para avaliação do controle de fluxos de emergência de plantas daninhas pelo herbicida imazapic. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 3, p. 535-542, 2005.

CHRISTOFFOLETI, P.J. **Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase e acetil coenzima A carboxilase**. 2000. 211 p. Tese (Livre-docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

_____. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 513-519, 2002.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; CORTEZ, M.G.; MONQUEIRO, P.A. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE MANEJO E CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS EM PLANTIO DIRETO, 3., 2001, Passo Fundo. **Resumo das palestras...** Passo Fundo: Aldeia Norte, 2001. p. 39-53.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; BORGES, A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; MONQUERO, P.A. Carfentrazone-ethyl aplicado em pós-emergência para o controle de *Ipomoea* spp. e *C. benghalensis* na cultura da cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 83-90, 2006.

DIAS, A.C.R.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. **Capim-colchão**: identificação e manejo na cultura da cana-de-açúcar. Piracicaba: ESALQ, 2009. 60 p.

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

DIAS, N.M.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; TORNISIELO, V.L. Identificação taxonômica de espécies de capim-colchão infestantes da cultura da cana-de-açúcar no estado de São Paulo e eficácia de herbicidas no controle de *Digitaria nuda*. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 389-396, 2005.

DIAS, N.M.P.; REGITANO, J.B.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; TORNISIELO, V.L. Absorção e translocação do herbicida diuron por espécies suscetível e tolerante de capim-colchão (*Digitaria* spp.). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 293-300, 2003.

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**. 3rd ed. Clemson, 1986. p. 29-45.

GALON, L.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, E.A.; SILVA, A.A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A.F.; REIS, M.R.; ASPIAZÚ, I.; FIALHO, C.M.T.; BARBOSA, M.H.P.; TIRONI, S.P. Tolerância de novos genótipos de cana-de-açúcar a herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 329-338, 2010.

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

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 1997. t. 1, p. 675-678.

KRUSE, N.D.; VIDAL, R.A.; TREZZI, M.M. Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 579-587, 2006.

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

MONQUERO, P.A.; BINHA, D.P.; INÁCIO, E.M.; SILVA, P.V.; AMARAL, L.R.; SILVA, A.C. Eficácia de herbicidas aplicados em diferentes épocas sobre *B. pilosa* e *I. quamoclit* em área de cana-de-açúcar colhida mecanicamente. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 563-570, 2009.

MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.

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

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, p. 2035-2042, 2001.

RONCHI, C.P.; SILVA, A.A.; MIRANDA, G.V.; FERREIRA, L.R.; TERRA, A.A. Misturas de herbicidas para o controle de plantas daninhas do gênero *Commelina*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 20, n. 2, p. 311-318, 2002.

SEEFELDT, S.S.; JENSEN, J.E.; FUERST, E.P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, Lawrence, v. 9, n. 2, p. 218-227, 1995.

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

VELINI, E.D. **Estudo e desenvolvimento de métodos experimentais e amostrais adaptados à matologia**. 1995. 250 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1995.

ZIMDAHL, R.L. **Fundamentals of weed science**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2007. 666 p.

3 CURVAS DE CRESCIMENTO DAS ESPÉCIES DE CAPIM-COLCHÃO *Digitaria ciliaris* E *Digitaria nuda*

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi comparar o crescimento das espécies de capim-colchão *D. ciliaris* e *D. nuda*, em condições não-competitivas. Para isso, foram conduzidos dois experimentos, um de março a julho de 2010 e outro de fevereiro a junho de 2011. O delineamento experimental de ambos os ensaios foi inteiramente casualizado, perfazendo um esquema fatorial (2 épocas x 2 espécies de capim colchão x 12 períodos de avaliação), com quatro repetições. As avaliações iniciaram-se aos 15 dias após a semeadura (DAS), e repetidas semanalmente até os 92 DAS. As variáveis avaliadas foram massa seca total (raízes+folhas+colmos), área foliar, número de folhas e de perfilhos. Os resultados foram submetidos a análise de variância e com as médias foram calculadas a taxa de crescimento absoluto, taxa de crescimento relativo e a razão de área foliar, as quais foram ajustadas a modelos de regressão. As espécies de capim-colchão diferiram entre si quanto a área foliar, numero de folhas, número de perfilho e matéria seca por planta. *D. ciliaris* para todas as variáveis foi estatisticamente superior em relação a *D. nuda*. Em relação à velocidade com que o crescimento das espécies ocorreu, verificou-se que a taxa de crescimento absoluto e relativo de *D. ciliaris* também foi superior a *D. nuda*. Além disso, *D. ciliaris* também teve menor razão de área foliar indicando maior eficiência na conversão de energia luminosa em carboidratos. Pode-se concluir que *D. ciliaris* apresenta maior crescimento, em condições onde não há limitações de nutrientes e disponibilidade hídrica, em relação a *D. nuda*, principalmente por apresentar maior área foliar, numero de folhas e acúmulo de matéria seca por planta. Estes resultados podem indicar maior capacidade competitiva da *D. ciliaris*, porém a confirmação deste aspecto somente poderá ser feito através de estudos em condições competitivas entre as duas espécies.

Palavras-chave: Curva de crescimento; Habilidade competitiva; Biologia de plantas daninhas

Abstract

The aim of this work was to compare the growth of crabgrass species *D. ciliaris* and *D. nuda*, under non-competitive conditions. Therefore, two experiments were conducted, one from March to July 2010 and another from February to June 2011. The experimental design of both trials was completely randomized, making a factorial (2 seasons x 2 species crabgrass x 12 evaluation periods) with four replications. Assessments began at 15 days after sowing (DAS), and repeated weekly until 92 DAS. The variables evaluated were total dry matter (roots + leaves + stems), leaf area, leaf number and tiller. The results were submitted to analysis of variance and with means were calculated absolute growth rate, relative growth rate and leaf area ratio, which

were adjusted regression models. The crabgrass species were significantly different in leaf area, leaf number, tiller number and dry matter per plant. *D. ciliaris* for all variables was statistically higher than in *D. nuda*. With regarding to speed at which the growth of the species occurred, the absolute growth rate and relative growth rate of *D. ciliaris* was also greater than *D. nuda*. In addition, *D. ciliaris* also had lower leaf area ratio indicating greater efficiency in converting light energy into carbohydrates. It can be concluded that *D. ciliaris* have higher growth, in conditions where there is no limitation of nutrients and water availability in relation to *D. nuda* mainly due to its greater leaf area, number of leaves and dry matter accumulation per plant. These results may indicate a greater competitive ability of *D. ciliaris*, but confirmation of this aspect can only be done through further study under competitive conditions between the two species.

Keywords: Growth curve; Competitive ability; Weed biology

3.1 Introdução

Dentre as espécies de plantas daninhas conhecidas como capim-colchão destacam-se como importantes na agricultura brasileira: *Digitaria ciliaris*, *D. nuda*, *D. bicornis*, *D. horizontalis*. São plantas pertencentes à família botânica Poaceae (Gramineae), subfamília Panicoideae, tribo Paniceae, com distribuição bastante ampla no território brasileiro, presentes nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país (CANTO-DOROW, 2001; DIAS et al., 2007).

Porém, em canaviais da região sudeste tem sido observado uma alteração na dinâmica populacional de ocorrência das espécies de *Digitaria*, popularmente conhecido como “complexo de espécies de *Digitarias*”. Dentre as proporções observadas no complexo de *Digitarias*, a *D. nuda* tem dominado comunidades de *Digitaria*, em que anteriormente era ela considerada rara. Uma das razões apontadas para esta alteração de dinâmica populacional no complexo das espécies de *Digitaria* é a aplicação consecutiva, por vários anos, de herbicidas inibidores do fotossistema II (FSII) e/ou herbicidas do grupo químico das imidazolinonas (inibidores da acetolactato sintase (ALS). A estes herbicidas a *D. nuda* apresenta uma suscetibilidade diferencial menor que as demais espécies de *Digitarias*, justificando assim o aumento da frequência desta espécie no complexo de *Digitarias* em uma área de cana-de-açúcar (DIAS et al., 2005).

Em estudos conduzidos por Dias et al. (2003), *D. nuda* apresentou maior tolerância em relação a *D. ciliaris*, porém o mecanismo de tolerância apresentado pela *D. nuda* ainda não está devidamente esclarecido. Foi observado também no estudo

citado, que a absorção foliar e a translocação diferencial de herbicidas pelas plantas de *Digitaria* não são os mecanismos relacionados a essa tolerância. A suscetibilidade diferencial, apresentada pelas espécies de capim-colchão, tem prejudicado a eficácia de alguns ingredientes ativos usados no controle químico na cultura da cana-de-açúcar (DIAS et al., 2007).

Além da pressão de seleção que os herbicidas exercem sobre a dinâmica populacional de espécies de plantas daninhas é importante também considerar a adaptabilidade ecológica das espécies presentes nos complexo de plantas. O conhecimento da adaptabilidade ecológica pode explicar em parte as razões da predominância de uma espécie sobre outra na comunidade de plantas daninhas, principalmente quando estas espécies são do mesmo gênero. Adaptabilidade ecológica é definida geralmente como o sucesso reprodutivo ou a proporção de genes que um indivíduo deixa no conjunto de genes da população (CHRISTOFFOLETI et al., 1994). Os dois componentes fundamentais da adaptação ecológica são: sobrevivência e reprodução (SILVERTOWN, 1987).

Os herbicidas impõem grande pressão de seleção, que pode levar a mudanças na comunidade de infestantes. Assim, em ambientes bastantes restritivos como é o caso de ambientes sujeitos a herbicidas, a adaptação de espécies a esse novo ambiente pode em muitas vezes, vir acompanhada do desenvolvimento de genes pleiotrópicos negativos, atuando sobre a aptidão ao ambiente original. Esse fato é chamado de custo de adaptação (PURRINGTON, 2000; VILA-AIUB et al., 2009). Então pode haver diferença no padrão de crescimento e desenvolvimento de plantas tolerantes e resistentes, em relação a plantas suscetíveis, em condições onde não existe o efeito selecionador dos herbicidas, fazendo com que os indivíduos suscetíveis tenham maior habilidade competitiva e conseqüentemente maior frequência em ambientes com baixa pressão de seleção (BAUCOM; MAURICIO, 2004).

Para a aplicação do manejo integrado de plantas daninhas de forma efetiva é fundamental o conhecimento da biologia das espécies de plantas daninhas presentes na área (RAVINDRA et al., 2008). Dessa forma, no manejo integrado do complexo de espécies de *Digitaria* é necessário ampliar os conhecimentos a respeito da biologia das espécies do gênero *Digitaria*, que são tolerantes e suscetíveis a herbicidas.

De forma geral, se uma planta tem maior habilidade competitiva em relação a outras plantas, então essa é dotada basicamente de rapidez na expansão foliar, crescimento inicial rápido e ciclo de desenvolvimento longo para garantirem prioridade e vantagem na utilização dos recursos do meio (BALBINOT JUNIOR et al., 2003). Então, se uma planta tolerante e/ou resistente apresentar custo adaptativo esse pode ser detectado por meio de comparações de crescimento e desenvolvimento com indivíduos suscetíveis. Uma maneira bastante utilizada e fácil de inferir a contribuição de diferentes processos fisiológicos para o crescimento vegetal, tornando possível o conhecimento da cinética de produção de biomassa das plantas, sua distribuição e eficiência ao longo da ontogenia é com análises de crescimento (BENINCASA, 2003; CARVALHO et al., 2008).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi comparar a adaptabilidade ecológica, por meio do crescimento e desenvolvimento comparativo entre as espécies, relacionado com a hipótese de que o maior desenvolvimento de *D. ciliaris* inibe a ocorrência de *D. nuda* onde não existe o fator selecionador dos herbicidas. Contribuindo assim para o entendimento da mudança na comunidade de infestantes da cultura da cana-de-açúcar, na região sudeste do Brasil. Este conhecimento pode servir de base para a fundamentação do manejo integrado do complexo de espécies de *Digitaria* na cultura da cana-de-açúcar.

3.2 Material e Métodos

O estudo foi realizado em casa-de-vegetação pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da ESALQ – USP, no município de Piracicaba, 22° 42' 29.98" S, 47° 37' 42.95" W e 546 m de altitude, em duas épocas: de março a julho de 2010 e Fevereiro-Junho de 2011. O delineamento experimental utilizado em cada experimento (época) foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial com quatro repetições. Os fatores foram duas espécies de capim-colchão (*Digitaria ciliaris* e *Digitaria nuda*) e 12 períodos de avaliação: 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85 e 92 dias após a semeadura (DAS) em cada época. As unidades experimentais foram vasos com capacidade de 1,1 L, preenchidos com solo adubado com a dose proporcional à

aplicação de 500 kg ha⁻¹ da fórmula comercial 10-10-10 (NPK), e irrigadas diariamente através de um sistema de irrigação automático para que não houvesse deficiência hídrica. Os vasos foram mantidos sem a infestação de outras plantas daninhas através do arranquio manual. As propriedades físico-químicas do solo utilizado em ambos os experimentos estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Análise físico-química do solo utilizado nos experimentos (março a julho de 2010 e fevereiro a 2011) de crescimento e desenvolvimento de *D. ciliaris* e *D. nuda*

Composição Granulométrica ¹ (%)			pH(CaCl ₂)	M.O(g dm ⁻³)	P (mg dm ⁻³)	V(%)
Areia	Silte	Argila	4,4	48,0	4,0	48,0
77	3	20				
Cátions Trocáveis (mmol _c dm ⁻³)						
K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SB	H+Al	CTC	
0,1	15,0	9,0	24,1	26,0	50,1	

(¹) Textura média arenosa; (²)SB – soma de bases; CTC – capacidade de troca catiônica; V – saturação por bases

Os diásporos de ambas as espécies foram coletados em canaviais comerciais no Estado de São Paulo, Brasil. Após a coleta, estes foram taxonomicamente identificados de acordo com a chave analítica de identificação proposta por Cantor-Dorow (2001) e embalados em sacos de papel e acondicionados em um lugar seco à temperatura ambiente até o início do trabalho. Os diásporos de cada uma das duas espécies foram semeados em vasos separadamente, em quantidades necessárias para a germinação de cinco plântulas. Quando essas plântulas estavam no estágio de desenvolvimento de duas folhas verdadeiras, desbaste foi realizado objetivando-se deixar apenas uma planta por vaso.

Em cada avaliação, as plantas foram amostradas pelo método destrutivo, lavados em água corrente para remover o substrato remanescente nas raízes. As folhas foram passadas em um medidor de área foliar modelo LICOR LI-3100 (LI-COR, inc., Lincoln, Nebraska, EUA). Em seguida, as folhas foram colocadas em sacos de papel, bem como as outras partes da planta separada em caules e raízes para a secagem do material em estufa a 70 ° C por 72 horas. Além disso, foram contados no número de

folhas verdes e número de perfilhos produzidos por espécies durante todo o período experimental.

Os dados de matéria seca total (folhas + colmos + raízes), área foliar, número de folhas verdes e número de perfilhos foram submetidos à análise de variância. Os dados foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$) para verificar diferenças entre as espécies em cada avaliação. Com as médias dessas variáveis foram calculados a taxa de crescimento absoluto (g dia^{-1}), que fornece uma estimativa da velocidade média de crescimento da planta ao longo do ciclo de desenvolvimento, a taxa de crescimento relativo ($\text{g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) que expressa a crescimento em gramas de matéria seca por unidade de material presente em um período de observação (BENINCASA, 2003; CARVALHO et al., 2008). Também foram calculados a razão de área foliar (RAF) ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$) que é a quantidade de área foliar necessários para produzir um grama de matéria seca (BENINCASA, 2003; SILVA et al., 2005). Todas as variáveis foram submetidas à regressão não-linear para modelar o crescimento das espécies.

A massa seca total, número de perfilhos, a taxa de crescimento relativo e razão de área foliar foram ajustados para modelo de regressão não-linear do tipo logístico, adaptado de Streibig (1988) (eq. 3.1):

$$y = \frac{a}{\left[1 + \left(\frac{x}{b} \right)^c \right]} \quad (3.1)$$

em que: y é a variável resposta de interesse, x o número de dias acumulados e a , b , e c são parâmetros estimados da equação (a é a amplitude existente entre o ponto máximo e o ponto mínimo da variável; b é corresponde ao número de dias necessários para a ocorrência de 50% de resposta da variável e c é a declividade da curva ao redor de b) (CARVALHO et al., 2008).

Área foliar, número de folhas e a taxa de crescimento absoluto foram ajustados por regressão não-linear do tipo log-normal, com três parâmetros (adaptado de FERREIRA JUNIOR, 2010; LIMPET et al., 2001) (eq. 3.2):

$$y = a \exp \left[-0,5 \left(\frac{\ln(x/b)}{c} \right)^2 \right] \quad (3.2)$$

em que: y é a variável resposta de interesse, x o número de dias acumulados e a, b, e c são parâmetros estimados da equação (a é a amplitude, b é o valor de x no qual y é máximo e c indica o grau de decaimento da variável y)

3.3 Resultados e Discussão

Foi encontrada diferença significativa para os dias após a semeadura para todas as variáveis (Tabela 3.2). Este fato já era esperado uma vez que o crescimento ao longo dos dias de uma planta é por meio de variações de tamanho em algum aspecto resultante da fotossíntese líquida (BENICASSA, 2003). Também foram encontradas diferenças significativas para as épocas dos experimentos, para todas as variáveis (Tabela 3.2). Isto indica que a espécie sofreu influência do ambiente em que foram estudados, principalmente porque não havia controle ambiental na casa-de-vegetação, onde os estudos foram realizados.

Tabela 3.2 - Média das variáveis de duas épocas de crescimento de duas espécies de capim-colchão, com os resultados da análise de variância

Espécie	Área foliar	Nº Folhas	Nº Perfilhos	Matéria seca
<i>D. ciliaris</i>	131,287A	31,489A	13,057A	5,823A
<i>D. nuda</i>	86,693B	28,176B	11,142B	2,415B
F DAS ¹	241,571**	105,698**	75,823**	294,708**
F esp. ²	291,095**	15,257**	22,062**	994,574**
F época	1050,83**	417,286**	348,305**	1639,263**
F DAS x esp. ²	29,893**	13,736**	5,959**	45,480**
F DAS x época	123,002**	55,156**	33,171**	211,119**
F esp. x época	12,257**	0,266	16,225**	193,423**
F esp. x época x DAS	14,985**	5,947**	6,382**	41,074**
CV(%)	15,910	18,860	22,350	17,400

¹DAS = dias após a semeadura; ²esp. = espécie; ** significativo (p<0,01); * significativo (p<0,05)

Mesmo com as mudanças ambientais as espécies diferiram em todas as variáveis (Tabela 3.2). Verificou-se que *D. ciliaris* obteve maior área foliar, número de folhas, número de perfilhos e massa seca em relação a *D. nuda*. Para maior compreensão do comportamento das espécies foi apresentado desdobramento da interação de espécies com dias após a semeadura, juntamente com as equações não-lineares que modelam o crescimento. O comportamento da espécie é melhor compreendido quando se observa as espécies com desdobramento dias após a semeadura. Este é representado pelas características não-lineares das variáveis de crescimento das espécies (Figuras 3.1-3.7). Os parâmetros dos modelos utilizados para descrever o comportamento da matéria seca, área foliar, número de folhas, número de perfilhos, taxa de crescimento absoluto, taxa de crescimento relativo e razão de área foliar durante o ciclo de desenvolvimento de espécies de capim-colchão são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Parâmetros do modelo e coeficiente de determinação obtido para a modelagem das variáveis de crescimento e desenvolvimento de duas espécies de capim-colchão

Variáveis	Espécie	Parâmetros			R ²	F
		a	b	c		
Área foliar ² (cm ⁻²)	<i>D. ciliaris</i>	239,258**	52,616**	0,329**	0,867	33,667
	<i>D. nuda</i>	146,502**	55,887**	0,348**	0,791	19,950
Nº folhas ² (planta ⁻¹)	<i>D. ciliaris</i>	49,812**	55,953**	0,369**	0,855	30,559
	<i>D. nuda</i>	41,296**	66,205**	0,431**	0,817	23,269
Nº perfilhos ¹ (planta ⁻¹)	<i>D. ciliaris</i>	18,685**	37,275**	-4,303*	0,817	23,329
	<i>D. nuda</i>	15,098**	38,152**	-5,664*	0,815	23,081
Matéria seca ¹ (g planta ⁻¹)	<i>D. ciliaris</i>	12,580**	57,347**	-4,240**	0,953	103,012
	<i>D. nuda</i>	5,243**	57,704**	-4,606	0,689	12,117
Taxa crescimento absoluto ² (g dia ⁻¹)	<i>D. ciliaris</i>	0,397**	71,066**	0,527**	0,591	6,049
	<i>D. nuda</i>	0,599**	73,698*	0,145	0,909	41,031
Taxa de crescimento relativo ¹ (g g ⁻¹ dia ⁻¹)	<i>D. ciliaris</i>	0,685**	35,357*	15,894	0,946	71,114
	<i>D. nuda</i>	0,545**	37,459**	7,787*	0,938	46,133
Razão de área foliar ¹ (cm ² g ⁻¹)	<i>D. ciliaris</i>	2376,417	7,313	2,075*	0,995	1036,719
	<i>D. nuda</i>	312,856**	35,188**	3,373*	0,967	162,874

(¹) Modelo: $y = a/(1+(x/b)^c)$; (²) $y = a \exp(-0,5(\ln(x/b)/c)^2)$; ** significativo ($p < 0,01$); * significativo ($p < 0,05$)

Estes indicam que as equações utilizadas têm boa aplicação para interpretação biológica do crescimento da *D. ciliaris* e *D. nuda*, evidenciado pelo elevado coeficiente de determinação das curvas.

A área foliar das plantas de capim-colchão variou ao longo do ciclo de avaliação experimental (Figura 3.1). No início do ciclo, 15 e 22 DAS, as espécies não diferiram. Mas a partir de 29 DAS *D. ciliaris* apresentou área foliar por planta quantitativamente maior do que *D. nuda* na maior parte do ciclo. Finalmente, as duas espécies reduziram a área foliar no final do ciclo, devido à senescência da planta, e não foram estatisticamente diferentes entre si, neste ponto do ciclo. Além disso, a primeira atingiu seu crescimento máximo aos 52 DAS, enquanto *D. nuda* chegou a 55 DAS (parâmetro b na Tabela 3.3).

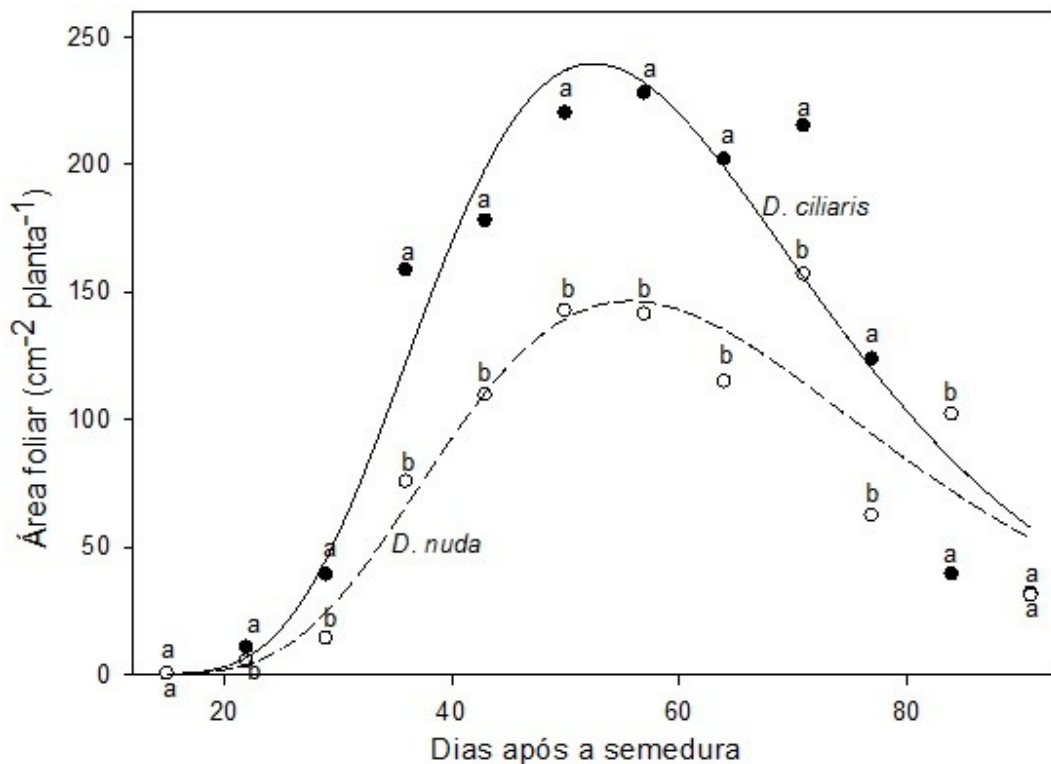


Figura 3.1 - Área foliar das plantas capim-colchão em função dos dias após a semeadura das espécies *D. ciliaris* e *D. nuda*. Os valores representam a média das duas épocas avaliadas. Mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) no mesmo dia após a semeadura

Semelhantemente ao que ocorreu com a área foliar, o número de folhas das espécies não diferiu de 15 e 22 DAS (Figura 3.2). Depois disso, *D. ciliaris* apresentou maior número de folhas em relação a *D. nuda* na maior parte do ciclo. Além disso, *D. ciliaris* atingiu o número máximo de folhas aos 55 DAS, enquanto *D. nuda* alcançou este parâmetro aos 66 DAS (parâmetro b na Tabela 3.3). Isso indica uma tendência a *D. ciliaris* completar a sua ciclo de crescimento mais cedo do que *D. nuda* (Figura 3.2).

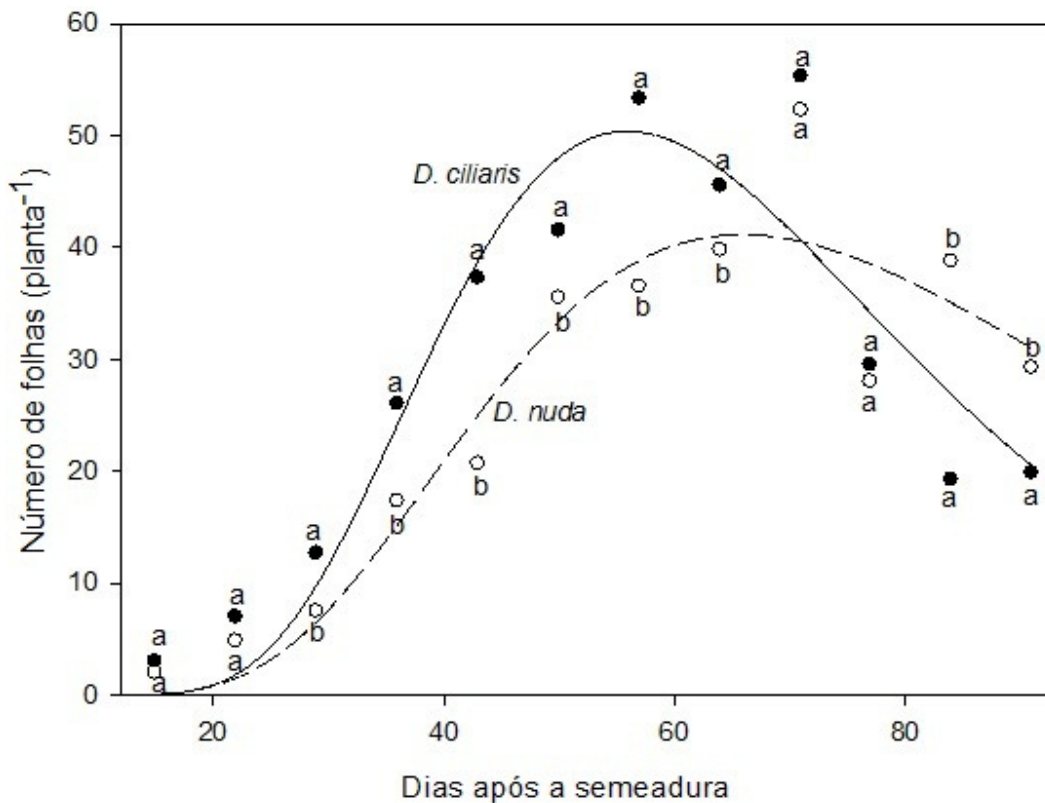


Figura 3.2 - Número de folhas das plantas capim-colchão em função dos dias após a semeadura das espécies *D. ciliaris* e *D. nuda*. Os valores representam a média das duas épocas avaliadas. Mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) no mesmo dia após a semeadura

Como a área foliar é responsável pela interceptação da radiação fotossinteticamente ativa e posterior conversão de energia luminosa em biomassa, esta é uma variável que influencia o crescimento das plantas (LIZASO et al., 2003). Assim, o comportamento exibido por *D. ciliaris* torna esta espécie com maior potencial para produção de biomassa em relação a *D. nuda*. Além disso, *D. ciliaris* completa o seu

ciclo de desenvolvimento mais rapidamente, pois as fases de desenvolvimento foliar envolvem a emissão de folhas novas, expansão foliar e senescência (POURREZA et al., 2009). Fato evidenciado por *D. ciliaris* obter máxima área foliar e número de folhas mais precocemente que *D. nuda* (Tabela 3.3). Outro fato a ser observado é que em alguns casos, a área foliar pode influenciar capacidade competitiva interespecífica por causa da produção de biomassa potencial.

Em estudos com cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) em uma tentativa de selecionar algumas características morfológicas para aumentar a capacidade competitiva com *Avena fatua* L., os autores concluíram que as cultivares que tiveram o maior número de perfilhos por planta, área foliar e taxa de crescimento rápido em altura são aqueles com forte capacidade competitiva (BOGALE et al., 2011). Carvalho et al. (2008) observaram diferenças no número de folhas e área foliar de espécies de plantas daninhas pertencentes ao mesmo gênero, onde foi avaliado o crescimento e desenvolvimento das espécies do gênero *Amaranthus*. A espécie *A. viridis* que mostrou maior área foliar durante a fase inicial do ciclo vegetativo, foi quem teve a melhor adaptabilidade ecológica em relação às outras. Porém, além desses fatores devem ser levados em consideração também outros fatores, como alelopatia e plasticidade da planta ao ambiente na adaptação ecológica das espécies (ZUO et al., 2008).

O número de perfilhos das espécies de capim-colchão variou ao longo do ciclo de avaliação experimental. As espécies diferiram em 43, 57 e 92 DAS, onde *D. ciliaris* apresentou maior número de perfilhos (Figura 3.3). *D. ciliaris* emitiu 50% do máximo de perfilhos aos 37 DAS enquanto que *D. nuda* levou 38 DAS para chegar a este parâmetro (parâmetro b na Tabela 3.3). A espécie com maior área foliar e número de folhas também foi a que obteve mais perfilhos por planta. Então, *D. ciliaris* possivelmente devido à sua maior capacidade de capturar energia luminosa foi capaz de gerar mais perfilhos por planta e, conseqüentemente, maior biomassa em relação a *D. nuda*.

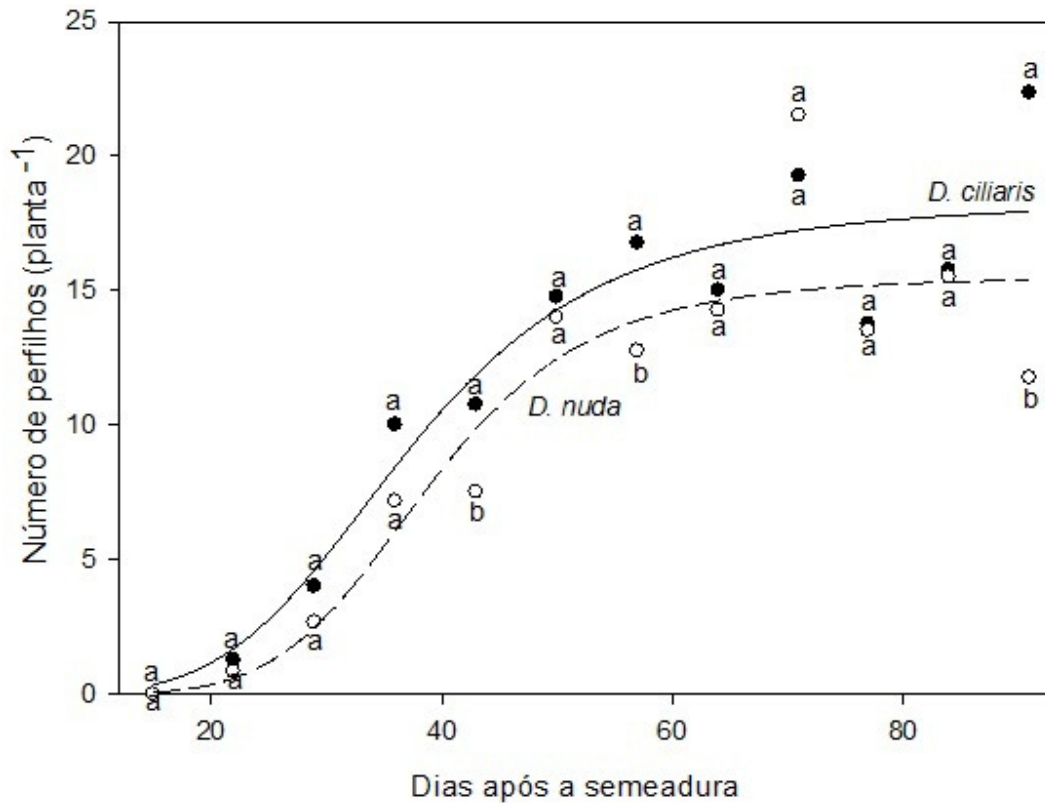


Figura 3.3 - Número de perfilhos das plantas de capim-colchão em função dos dias após a semeadura das espécies *D. ciliaris* e *D. nuda*. Os valores representam a média das duas épocas avaliadas. Mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) no mesmo dia após a semeadura

Assim como ocorreu com a área foliar, a matéria seca das plantas capim-colchão variou durante o ciclo das espécies estudadas (Figura 3.4). Plantas com maior área foliar, número de folhas e perfilhos durante o período experimental (*D. ciliaris*) produziram mais matéria seca em relação às plantas com as variáveis mais baixas (*D. nuda*). As espécies atingiram 50% do seu máximo de matéria seca em 57 e 58 DAS, respectivamente (b parâmetro na Tabela 3.3).

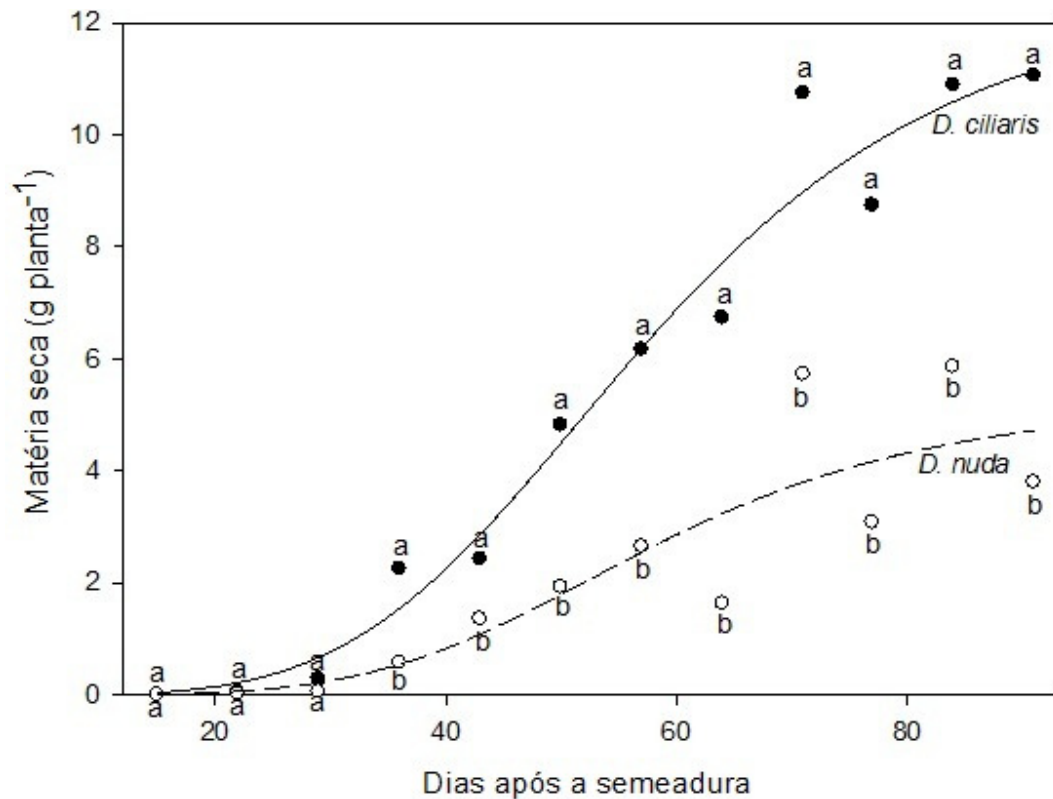


Figura 3.4 - Matéria seca das plantas de capim-colchão em função dos dias após a semeadura das espécies *D. ciliaris* e *D. nuda*. Os valores representam a média das duas épocas avaliadas. Mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) no mesmo dia após a semeadura

O acúmulo de matéria seca durante o ciclo de uma espécie está intimamente relacionado à capacidade de competir com outras plantas. Isso reflete diretamente a capacidade de captura de recursos do meio. Este fato foi observado por Gaudet e Keddy (1988), quando avaliaram a capacidade competitiva de 44 espécies herbáceas de plantas em experimentos em vasos e descobriram que a biomassa foi um bom fator de predição da competitividade. Esse fator explicou 63% da variação na capacidade competitiva. Nos estudos de Lopez-Ovejero et al. (2007), com populações de plantas de *D. ciliaris* resistente (R) e suscetível (S) a herbicidas inibidores da ACCase, não encontraram diferença, entre os biótipos R e S, no acúmulo de matéria seca em condições não-competitivas. E, portanto, concluíram que esses biótipos são equivalentes na competitividade, onde o biótipo R não apresentou custo de adaptabilidade para o desenvolvimento de resistência. Mas em alguns casos, os biótipos R e S podem diferir no acúmulo de matéria seca das plantas e nos custos de

adaptabilidade, como é o caso de *Amaranthus powellii* resistente a herbicidas inibidores da ALS (TARDIF et al., 2006). Assim, as espécies de capim-colchão possivelmente têm capacidade competitiva distinta e um custo de adaptabilidade para a tolerância de *D. nuda*, que acumulou menos matéria seca.

A taxa de crescimento absoluto das espécies de capim-colchão aumentou lentamente no início do período experimental (Figura 3.5). A taxa permaneceu mais alta durante maior parte do crescimento de *D. ciliaris* em relação a *D. nuda*. De acordo com o modelo empregado *D. ciliaris* alcançou taxa de crescimento absoluto máximo aos 71 DAS, enquanto *D. nuda* atingiu esse parâmetro em 73 DAS (parâmetro b na Tabela 3.3). Este fato também contribuiu para o maior acúmulo de matéria seca por planta para *D. ciliaris* em relação a *D. nuda*.

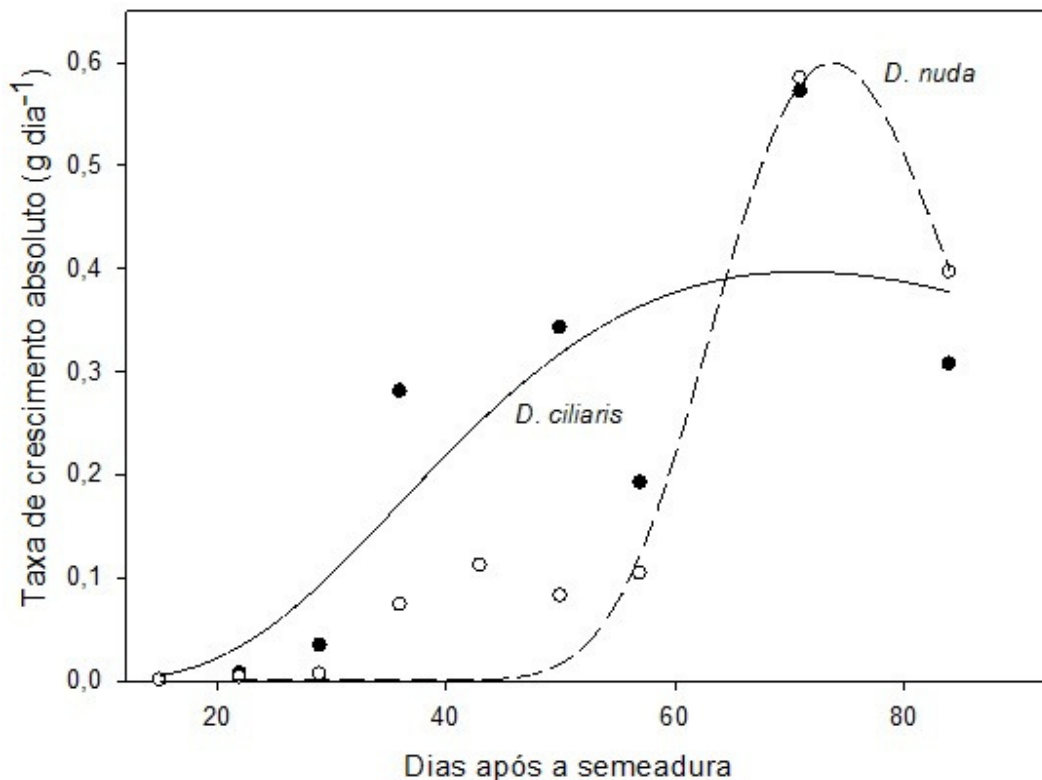


Figura 3.5 – Taxa de crescimento absoluto das plantas de capim-colchão em função dos dias após a semeadura das espécies *D. ciliaris* e *D. nuda*. Os valores representam a média das duas épocas avaliadas

Outro fator que ainda contribuiu para a maior matéria seca de *D. ciliaris* foi a maior taxa de crescimento relativo ao longo dos iniciais (Figura 3.6). A taxa de crescimento tem sido uma característica chave usada para descrever as plantas com diferentes estratégias ecológicas. Plantas com alta taxa de crescimento relativo nas fases iniciais do ciclo de crescimento, visando a rápida aquisição de nutrientes em ambientes sem limitações é uma característica associada com gramíneas anuais em geral (JAMES et al., 2011).

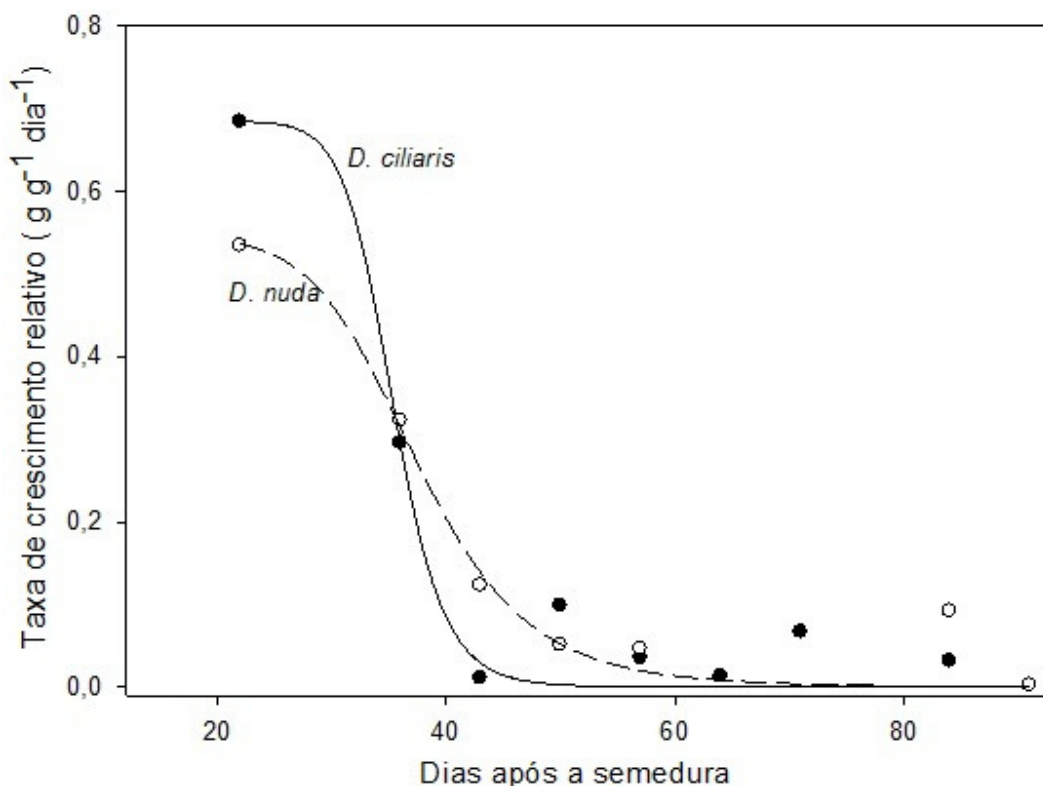


Figura 3.6 – Taxa de crescimento relativo das plantas de capim-colchão em função dos dias após a semeadura das espécies *D. ciliaris* e *D. nuda*. Os valores representam a média das duas épocas avaliadas

Finalmente, a razão de área foliar também se mostrou diferente entre as espécies capim-colchão (Figura 3.7). As espécies com maior área foliar e acúmulo de matéria seca foi a que apresentou o menor RAF durante a maior parte do ciclo. Assim, há evidência de uma maior eficiência na conversão de energia solar em carboidratos por *D. ciliaris*. A menor eficiência na produção de matéria seca de *D. nuda*, pode estar

associada com potencial fotossintético reduzido, como em casos de resistência às triazinas, onde biótipos resistentes por causa desse potencial apresentam baixa taxa de crescimento reduzido, baixa capacidade competitiva por recursos e pobres reprodução sexual, dependendo das condições ambientais em que as plantas estão sujeitas (ARNTZ et al., 2000).

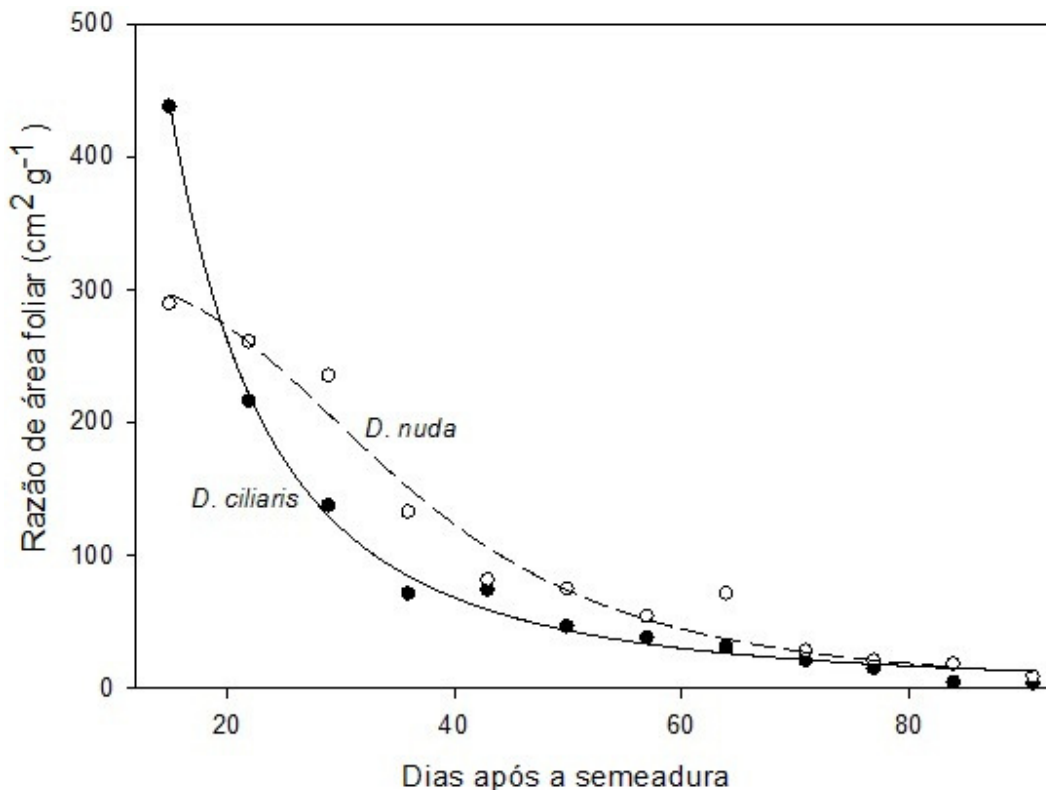


Figura 3.7 – Razão de área foliar das plantas de capim-colchão em função dos dias após a semeadura das espécies *D. ciliaris* e *D. nuda*. Os valores representam a média das duas épocas avaliadas

Com esses resultados, mais estudos são sugeridos para melhorar compreensão dos possíveis custos de adaptabilidade apresentada por *D. nuda*. Pois além do crescimento vegetativo esta espécie pode ter outras características diferentes das demais espécies de capim-colchão, relativas ao processo de produção de sementes, fato já observado para *Ipomoea purpurea* em relação à tolerância ao glifosato (BAUCOM; MAURICIO, 2004). Também é preciso descobrir a base molecular e bioquímica da tolerância por *D. nuda*, para poder obter mais avanços sobre o conhecimento da adaptabilidade dessa espécie (VILA-AIUB et al., 2009).

3.4 Conclusões

Pode-se concluir que *D. ciliaris* têm maior crescimento, em condições onde não há limitação de nutrientes e disponibilidade de água em relação a *D. nuda*, principalmente devido à sua maior área foliar, número de folhas e acúmulo de matéria seca. Estes resultados podem indicar maior capacidade competitiva da *D. ciliaris*, porém a confirmação deste aspecto somente poderá ser feito através de estudos em condições competitivas entre as duas espécies.

Referências

- ARNTZ, A.M.; DELUCIA, E.H.; JORDAN, N. Fitness effects of a photosynthetic mutation across contrasting environments. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 13, p. 792–803, 2000.
- BALBINOT JUNIOR, A.; FLECK, N.G.; BARBOSA NETO, J.F.; RIZZARDI, M.A. Características de plantas de arroz e a habilidade competitiva com plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 165-174, 2003.
- BAUCOM, R.S.; MAURICIO, R. Fitness costs and benefits of novel herbicide tolerance in a noxious weed. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, n. 361, p. 13386–13390, 2004.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas, noções básicas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41 p.
- BOGALE, A.; NEFO, K.; SEBOKA, H. Selection of some morphological traits of bread wheat that enhance the competitiveness against wild oat (*Avena fatua* L.). **World Journal of Agricultural Sciences**, Faisalabad, v. 7, n. 2, p. 128-135, 2011.
- CANTO-DOROW, T.S. Digitaria Heister ex Haller. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M. (Ed.). **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: HUCITEC, 2001. p. 143-150.
- CARVALHO, S.J.P.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Crescimento e desenvolvimento de cinco espécies de plantas daninhas do gênero *Amaranthus*. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 2, p. 317-326, 2008.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTÓRIA FILHO, R.; SILVA, C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 12, n. 1, p. 13-20, 1994.

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

DIAS, N.M.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; TORNISIELO, V.L. Identificação taxonômica de espécies de capim-colchão infestantes da cultura da cana-de-açúcar no estado de São Paulo e eficácia de herbicidas no controle de *Digitaria nuda*. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 389-396, 2005.

DIAS, N.M.P.; REGITANO, J.B.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; TORNISIELO, V.L. Absorção e translocação do herbicida diuron por espécies suscetível e tolerante de capim-colchão (*Digitaria* spp.). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 293-300, 2003.

FERREIRA JUNIOR, R.A. **Crescimento de variedades RB de cana-de-açúcar irrigadas e fotossíntese modelada pela radiação solar**. 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2010.

GAUDET, C.L.; KEDDY, P.A. A comparative approach to predicting competitive ability from plant traits. **Nature**, London, v. 334, p. 242-243, 1988.

JAMES, J.J.; DRENOVSKY, R.E.; MONACO, T.A.; RINELLA, M.J. Managing soil nitrogen to restore annual grass-infested plant communities: effective strategy or incomplete framework? **Ecological Applications**, Boulder, v. 21, n. 2, p. 490–502, 2011.

LIMPERT, E.; STAHEL, W.A.; ABBT, M. Log-normal distributions across the sciences: keys and clues. **BioScience**, Washington, v. 51, n. 5, p. 341-352, 2001.

LIZASO, J.I.; BATCHELOR, W.D.; WESTGATE, M.E. A leaf area model to simulate cultivar-specific expansion and senescence of maize leaves. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 1-17, 2003.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; NOVO, M.C.S.S.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Crescimento e competitividade de biótipos de capim-colchão resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2007.

POURREZA, J.; SOLTANI, A.; NADERI, A.; AYNEHBAND, A. Modeling leaf production and senescence in wheat. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, Faisalabad, v. 6, n. 5, p. 498-507, 2009.

PURRINGTON, C.B. Costs of resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 305–308, 2000.

RAVINDRA, G.M.; SRIDHARA, S.; GIRIJESH, G.K; NANJAPPA, H.V. Weed biology and growth analysis of *Celosia argentea* L., a weed associated with groundnut and finger millet crops in southern India. **Communications in Biometry and Crop Science**, Warsaw, v. 3, n. 2, p. 80–87, 2008.

SILVA, A.C.; FERREIRA, L.R.; SILVA, A.A.; FERREIRA, F.A. Análise de crescimento de *Brachiaria brizantha* submetida a doses reduzidas de fluazifop-p-butil. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 85-91, 2005.

SILVERTOWN, J.W. **Introduction to plant population ecology**. 2nd ed. New York: Longman, 1987. 220 p.

STREIBIG, J.C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 479-484, 1988.

TARDIF, F.J.; RAJCAN, I.; COSTEA, M. A mutation in the herbicide target site acetohydroxy acid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 169, p. 251–264, 2006.

VILA-AIUB, M.M.; NEVE, P.; POWLES, S.B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 184, p. 751–767, 2009.

ZUO, S.; MA, Y.; SHINOBU, I. Ecological adaptation of weed biodiversity to the allelopathic rank of the stubble of different wheat genotypes in a maize field. **Weed Biology and Management**, Fukui, v. 8, p. 161–171, 2008.

4 ABSORÇÃO RADICULAR E TRANSLOCAÇÃO DO HERBICIDA DIURON PELAS PLANTAS DE CAPIM-COLCHÃO *Digitaria nuda* E *Digitaria ciliaris*.

Resumo

As espécies de capim-colchão apresentam tolerância diferencial a alguns herbicidas recomendados para a cultura da cana-de-açúcar. Porém o mecanismo de tolerância apresentado por *Digitaria nuda* ainda não está esclarecido, podendo ser que a absorção radicular diferenciada seja o fator predominante nesse caso. O objetivo do presente experimento foi quantificar a absorção radicular de diuron (^{14}C) por plantas de *D. nuda* (tolerante) e *D. ciliaris* (suscetível) ao longo do tempo, para verificar a relação da absorção radicular com a tolerância diferencial dessas espécies. Para isso, os diásporos das duas espécies foram semeados em bandejas contendo substrato comercial e 10 dias após a emergência, as plântulas foram transplantadas em copos com capacidade para 80 ml e preenchidos com solo de textura média. Sete dias após o transplante foi aplicada uma mistura de diuron comercial com diuron (^{14}C) ao solo, em dose equivalente a 3200 (g i.a ha $^{-1}$). A radioatividade média aplicada foi de 13,9 KBq por parcela. Após 3, 6, 16, 24, 48 e 72 horas da aplicação foi quantificada a radioatividade nas plantas de capim-colchão. Os dados mostraram que as plantas de *D. nuda* (tolerante) absorveram quantitativamente mais diuron em relação a *D. ciliaris* (suscetível), principalmente 3 e 6 horas após a aplicação. Porém 72 horas após a aplicação de diuron a absorção da espécie tolerante foi igual à espécie suscetível. As radioautografias também revelaram uma tendência de menor absorção de diuron por *D. nuda*. Pode-se concluir que absorção radicular é um mecanismo que contribui para a maior tolerância, em relação ao diuron, apresentada por *D. nuda*, podendo ser que outros mecanismos ainda estejam envolvidos na tolerância dessa espécie.

Palavras-chave: Tolerância a herbicida; Herbicidas inibidores do fotossistema II

Abstract

The crabgrass species exhibit differential tolerance to some herbicides recommended for sugarcane. But the mechanism of tolerance shown by *Digitaria nuda* is still unclear and may be different than the root uptake is the predominant factor in this case. The objective of this experiment was to quantify the root uptake of diuron (^{14}C) for plants of *D. nuda* (tolerant) and *D. ciliaris* (susceptible) over time, to verify the relationship of root uptake and translocation to the differential tolerance of these species. A mixture of commercial diuron and diuron (^{14}C) was applied to the soil, at doses equivalent to 3200 (g a.i ha $^{-1}$). The average applied radioactivity was 13.9 KBq per plot. After 3, 6, 16, 24, 48 and 72 hours after application the radioactivity was measured in plants of crabgrass. The data showed that plants of *D. nuda* (tolerant) absorbed quantitatively less diuron in relation to *D. ciliaris* (susceptible), especially 3 and 6 hours after application. But 72 hours after applying the absorption of diuron in tolerant specie was equal to the susceptible specie. The radioautografias also revealed a trend

toward lower absorption of diuron by *D. nuda*. It can be concluded that root uptake is a mechanism that contributes to greater tolerance in relation to diuron, by *D. nuda*, may be that other mechanisms are also involved in the tolerance of this species.

Keywords: Herbicide tolerance; Photosystem II inhibitor herbicides

4.1 Introdução

O diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) foi desenvolvido para agir no aparato fotossintético, como um inibidor da fotossistema II (FSII). Ele compete por um local comum de ligação na proteína D1 nas membranas tilacóides. O diuron por inibir o fluxo de elétrons no FSII, evita a redução de NADP⁺ necessário para a fixação de CO₂. Além disso, os inibidores FSII deslocam a plastoquinona Q_B no local de ligação na proteína D1 e, especificamente, bloqueiam o fluxo de elétrons de Q_A para Q_B (FAYEZ, 2000). Esse herbicida é usado tanto em pré como em pós-emergência inicial de diversas culturas como café, cana-de-açúcar e algodão (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Porém as plantas podem tolerar os herbicidas, sem grandes alterações no crescimento e desenvolvimento (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Dentro do gênero *Digitaria*, algumas espécies são conhecidas como capim-colchão e apresentam tolerância diferencial a herbicidas inibidores do FSII. Dessa forma, o controle dessas plantas daninhas fica prejudicado, principalmente onde ocorre predominância de *Digitaria nuda*, espécie comprovadamente tolerante ao diuron e tebutiuron. (DIAS et al., 2005). Entretanto o mecanismo de tolerância de *D. nuda* ainda não está elucidado (DIAS et al., 2007).

A base da seletividade de herbicidas é o nível de tolerância diferencial das plantas a um tratamento específico, dessa forma esse é um fator relativo. Assim, existem alguns fatores que influenciam na seletividade de herbicidas com o método de aplicação e a localização espacial ou temporal em relação à planta. Portanto, na ausência de limitações dos fatores citados o que predomina na seletividade dos herbicidas são as características morfológicas e fisiológicas das plantas (OLIVEIRA JUNIOR; INOUE, 2011). Os mecanismos que as plantas utilizam para tolerar/resistir aos herbicidas podem ser de dois tipos: os ligados ao sítio de ação e os não-ligados ao sítio de ação. (POWLES; YU, 2010). E dentro dos mecanismos não-ligados ao sítio de

ação incluem mecanismos que diminuem a quantidade de molécula tóxica no sítio de ação.

Para que a molécula de herbicida alcance o sítio de ação, algumas características estruturais das folhas, raízes e sistema vascular que podem influenciar no movimento dos herbicidas para dentro e dentro da planta. Dessa forma, pode ocorrer absorção e translocação diferencial dos herbicidas na planta, nas interfaces solo-raiz ou folha-ar onde esses são tipicamente encontrados (DEKKER; DUKE, 1995). Os herbicidas tem que passar por regiões metabolicamente não ativas (apoplasto), com posterior penetração na região protoplasmática (simplasto), independentemente se a absorção for radicular ou foliar. A absorção de herbicidas pela raiz da planta, como no caso do diuron, ocorre por difusão passiva da solução do solo pela epiderme (suberizada em tecidos velhos) e pelo córtex. Essas estruturas externas são separadas da endoderme radicular, que contém os tecidos vasculares, pelas Estrias de Caspary. Assim, a entrada de herbicida no sistema radicular, ocorre primariamente nas extremidades apical das raízes por conta que as Estrias de Caspary são menos desenvolvidas. Dentro do xilema o herbicida pode ser translocado para diferentes partes das plantas (DEKKER; DUKE, 1995; RODRIGUES, 2009).

Em algumas plantas resistentes a herbicidas, o mecanismo que contribuí para resistência é a absorção e translocação diferencial como no caso de *Arctotheca calendula* resistente ao paraquat (SOAR et al., 2003). No caso da tolerância ao glyphosate por algumas espécies de plantas daninhas, o fenômeno pode ser explicado por diferenças na absorção e na translocação do herbicida, como no caso de *Commelina benghalensis* e *Ipomoea grandifolia*. Nos estudos realizados por Dias et al. (2003) com *D. nuda*, em relação aplicação de diuron foliar, a espécie não apresentou diferença na absorção e translocação em relação a *Digitaria ciliaris* porém nesses estudos não foi realizado aplicação do diuron para absorção radicular. O objetivo do presente estudo foi quantificar a absorção radicular de diuron em plantas de capim-colchão tolerante (*D. nuda*) e suscetível (*D. ciliaris*), verificando a hipótese de que a absorção e translocação diferencial sejam o mecanismo de tolerância apresentado por *D. nuda*.

4.2 Material e Métodos

Os diásporos de ambas as espécies de capim-colchão (*D. ciliaris* e *D. nuda*) foram semeadas em substrato comercial e 10 dias após serem transplantadas em copos plásticos (80 ml) preenchidas com solo de textura média (20% argila; 77% areia; 3% silte, 48 g dm⁻³ de matéria orgânica). Após sete dias do transplântio, quando as plantas encontravam-se com 3-4 folhas antes do perfilhamento, foi realizada a aplicação do (¹⁴C) diuron ao solo. Os estudos de absorção radicular e translocação de diuron em plantas de capim-colchão foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP sob a orientação do Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo.

As soluções para aplicação foram preparadas diluindo-se o diuron marcado (¹⁴C) em uma calda contendo o produto comercial Diuron Nortox 500 SC®, de tal forma que a concentração final do herbicida seria equivalente à dose comercial de 3.200 g i.a. ha⁻¹, com um volume de calda de 200 L ha⁻¹. Um total de 13,9 KBq foi aplicado ao solo em cada parcela. A aplicação do herbicida foi realizada com micro-seringa, na forma de micro gotas, ao redor da planta para garantir uma distribuição mais uniforme possível. Todas as parcelas antes da aplicação foram irrigadas de modo a garantir que não houvesse deficiência hídrica, portanto, o herbicida seria prontamente absorvido pelas plantas.

A absorção e a translocação foram avaliadas 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação (HAA) do herbicida. Após cada período de incubação, as plantas foram retiradas dos copos, e divididas em duas partes (raízes e parte aérea). As análises dos tecidos das raízes e parte aérea foram realizadas através da oxidação em oxidador biológico (OX 500, Harvey Instruments). Posteriormente, a radioatividade foi quantificada por espectrometria de cintilação líquida (Packard TR-1600). A absorção e a translocação foram calculadas como sendo a porcentagem de radioatividade presente em cada parte da planta, em relação à radioatividade total aplicada por cada parcela.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, e posterior aplicação do teste de comparação múltipla (teste de Tukey) ao nível de 5%. Estudos qualitativos de absorção e translocação foram realizados por meio de autoradiografia. As plantas utilizadas neste estudo foram tratadas da mesma forma descrita anteriormente nos

estudos de absorção e translocação. As plantas foram lavadas, prensadas, secas e, a autoradiografia foi realizada em Radioimagem (Packard – Cyclone).

4.3 Resultados e Discussão

Os herbicidas do grupo químico das fenilúreias, como o diuron são rapidamente absorvidos pelas raízes e translocados em movimento acrópeto junto com o fluxo transpiratório em diversas plantas como algodão, milho e soja. O acúmulo do ^{14}C diuron nas porções áreas das plantas, após a absorção radicular depende em grande parte da taxa de transpiração (SMITH; SHEETS, 1967). Porém, diferenças nos padrões de transporte de dessa molécula podem explicar maior tolerância a este herbicida por algumas espécies como no caso de *Torilis arvensis* em relação à *Lolium rigidum* suscetível ao diuron (PRADO et al., 1990). A análise de variância apresentada mostrou que a absorção de diuron foi diferente entre *D. nuda* e *D. ciliaris*. Contudo, houve interação do horário de avaliação com as espécies estudadas (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Resumo do quadro da análise da variância para absorção e translocação de diuron em espécies de capim-colchão

Variável	Fonte de Variação	F	P
Absorção	Espécies (E)	14,546	0,002
	Horas após aplicação (HAA)	46,541	<0,001
	Interação (E*HAA)	11,027	0,002
Raízes	Espécies (E)	0,760	0,3980
	Horas após aplicação (HAA)	1,854	0,1667
	Interação (E*HAA)	0,337	0,8819
Parte aérea	Espécies (E)	0,749	0,4014
	Horas após aplicação (HAA)	1,897	0,1586
	Interação (E*HAA)	0,371	0,8600

O comportamento das espécies é melhor caracterizado quando se observa o total absorvido pelas plantas ao longo das horas após a aplicação do diuron. Observou-se que a espécie suscetível (*D. ciliaris*) absorveu quantitativamente mais diuron do que a tolerante (*D. nuda*) 6 e 12 horas após a aplicação (HAA). Porém as 48 HAA a

absorção de diuron foi maior na *D. nuda* em relação a espécie *D. ciliaris* e ao final do período de avaliação as espécies não diferiram entre si (Figura 4.1). Apesar dos baixos valores observados para absorção, em torno de 0,01% para *D. nuda* e 0,03% para *D. ciliaris*, esse fato já era esperado primeiramente devido ao fato que o diuron é em grande parte adsorvido ao solo (87- 96%) (GAILLARDON, 1997), restando assim menor quantidade de diuron disponível na solução do solo para ser absorvida pelas raízes das plantas. Além disso, a pequena quantidade de herbicida absorvido pelas plantas de capim-colchão deve-se ao fato de que as plantas utilizadas foram de tamanho pequeno fazendo com que a capacidade de absorção da solução do solo (com diuron) também fosse pequena.

A translocação de herbicidas ocorre quando as moléculas estão dentro da planta e são transportadas para o local onde desempenham a atividade fitotóxica. Esse movimento pode ser a distancias relativamente curtas ou por longas distancia via apoplasto e/ou simplasto e no caso do diuron essa ocorre principalmente através do xilema (DEKKER; DUKE, 1995; RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). As espécies de capim-colchão não diferiram entre si, quanto à translocação (Tabela 4.1). Esse fato ficou evidente por conta que o percentual de ^{14}C -diuron do total absorvido não diferiu entre *D. nuda* e *D. ciliaris* (Tabela 4.2), principalmente na parte aérea onde o herbicida é ativo. O local de ação do herbicida diuron é nas folhas, os sintomas de fitotoxicidade nas plantas pela ação do herbicida aparecem inicialmente nas folhas, que ficam com tonalidade verde-claro, tornando-se finalmente necróticas (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

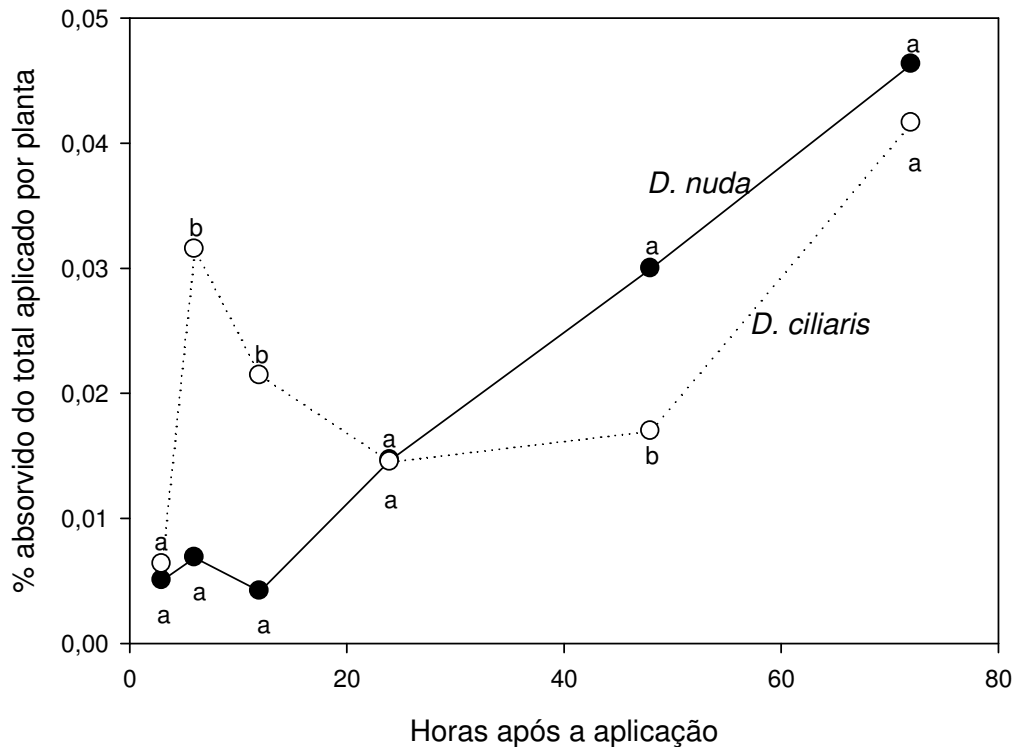


Figura 4.1 - Percentual de absorção de diuron por plantas de capim-colchão. Letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) dentro de cada horário de avaliação

Portanto, pode-se inferir que a translocação diferencial não está relacionada com a maior tolerância apresentada por *D. nuda*. Esse fato corrobora com os resultados de Dias et al. (2003), no qual a partir da aplicação de diuron nas folhas de *D. nuda* não gerou diferença na translocação em relação a *D. ciliaris*. A translocação também não é o mecanismo que conferiu resistência de biótipos de *Lolium rigidum* resistentes a chlorotoluron (PRADO et al., 1997), herbicida pertencente ao mesmo grupo químico do diuron. O mecanismo responsável pela resistência dos biótipos resistentes foi a metabolização do chlorotoluron via alquil oxidação, possivelmente com o envolvimento da enzima citocromo P450 mono oxigenase (PRADO et al., 1997). Contudo, no caso da tolerância de *T. arvensis* ao diuron, o herbicida é absorvido pelas folhas e fica limitado nos caules, pecíolos e nervuras não atingindo o limbo foliar onde é ativo (PRADO et al., 1990). Outro fator que deve ser levado em consideração em relação aos estudos de

translocação diferencial de herbicidas em espécies diferentes, é que esse fenômeno está intimamente ligado ao metabolismo das moléculas (DEKKER; DUKE, 1995).

Tabela 4.2 - Percentual do total absorvido presente nas diferentes partes das plantas de capim-colchão

Horas após aplicação	%Raiz		% Parte Aérea	
	<i>D. nuda</i>	<i>D. ciliaris</i>	<i>D. nuda</i>	<i>D. ciliaris</i>
3	37,857	50,214	62,143	49,787
6	67,264	59,129	31,517	40,871
12	65,796	76,509	34,204	23,676
24	67,679	63,312	32,424	36,987
48	33,053	57,264	67,096	42,409
72	33,707	42,911	66,417	56,976

Os estudos de autoradiografia das plantas ilustraram os resultados em ambas as espécies (Figura 4.2). As áreas mais escuras representam áreas com maior radioatividade. Nota-se que existe uma tendência da espécie suscetível (Figura 4.2a e 4.2b) absorver maior quantidade de diuron *D. nuda* (4.2c e 4.2d). Além disso, observa-se também que o herbicida alcançou as folhas das duas espécies, local em que a molécula de diuron irá se ligar ao fotossistema II e gerar os efeitos fitóxicos nas plantas. Reforçando assim o fato de que não existe translocação diferencial entre *D. nuda* e *D. ciliaris*.



Figura 4.2 - Autoradiografia após aplicação de ^{14}C -diuron nas espécies *Digitaria ciliaris* 72 horas após a aplicação (a), 48 horas após a aplicação (b) e *Digitaria nuda* 72 horas após a aplicação (c) e 48 horas após a aplicação (d)

Estudos futuros devem contemplar também a metabolização do diuron. Pois é outro importante mecanismo de resistência e/ou tolerância de plantas daninhas a herbicidas, sendo caracterizada pela capacidade que alguns biótipos ou espécies têm de degradar o herbicida em componentes menos tóxicos, antes que o produto alcance o seu sítio de ação. O aumento do metabolismo do fluazifop-p-butil em *D. sanguinalis* resistente ao herbicida fluazifop-p-butil no Sul da Austrália, foi o mecanismo responsável pela resistência desta população (HIDAYAT; PRESTON, 1997). Sabe-se que a principal transformação que as ureias substituídas sofrem é a N-desalquilação, N-desmetilação e alquil oxidação e que muitas dessas reações são mediadas pelas enzimas da família das P450 mono-oxigenase (PRADO et al., 1997; SIMINSZKY et al., 1999).

4.4 Conclusões

Conclui-se que a absorção diferencial de diuron está relacionada, pelo menos em parte, com a maior tolerância apresentada por *D. nuda* em relação a *D. ciliaris*. A translocação para a parte aérea não é diferente entre as plantas tolerante e suscetível de capim-colchão e, portanto não é mecanismo que confere tolerância a *D. nuda*.

Referências

- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Ed.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Piracicaba: HRAC, 2008. p. 9-34.
- DEKKER, J.; DUKE, O.S. Herbicide resistant field crop. **Advances in Agronomy**, New York, v. 54, p. 69-116, 1995.
- DIAS, N.M.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; TORNISIELO, V.L. Identificação taxonômica de espécies de capim-colchão infestantes da cultura da cana-de-açúcar no estado de São Paulo e eficácia de herbicidas no controle de *Digitaria nuda*. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 389-396, 2005.
- DIAS, N.M.P.; REGITANO, J.B.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; TORNISIELO, V.L. Absorção e translocação do herbicida diuron por espécies suscetível e tolerante de capim-colchão (*Digitaria* spp.). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 293-300, 2003.

- 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**, New York, v. 66, p. 105–115, 2000.
- GAILLARDON, P. Desorption of diuron and isoproturon from undispersed clay loam soil. **Pesticide Science**, London, v. 51, p. 185-193, 1997.
- HIDAYAT, I.; PRESTON, C. Enhanced metabolism of fluazifop acid in a biotype of *Digitaria sanguinalis* resistant to the herbicide fluazifop-p-butyl. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 57, p. 137-146, 1997.
- OLIVEIRA JUNIOR, R.S; INOUE, M.H. Seletividade de herbicidas para culturas e plantas daninhas. In: OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Ed.) **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 243-262.
- POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 317-347, 2010.
- PRADO, P.; SCALLA, R.; GAILLARDON, P. Differential toxicity of simazine and diuron to *Torilis arvensis* and *Lolium rigidum*. **Weed Research**, Oxford, v. 30, p. 213-221, 1990.
- PRADO, R.; PRADO, J.L.; MENENDEZ, J. Resistance to substituted urea herbicides in *Lolium rigidum* biotypes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 57, p. 126–136, 1997.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: Edição dos autores, 2005. 592 p.
- RODRIGUES, J.D. Absorção e transporte de solutos nas plantas. In: VELINI, E.D; MESCHEDE, D.K.; CARBONARI, C.A.; TRINDADE, M.L.B. (Ed.) **Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, 2009. p. 31-112.
- SIMINSZKY, B.; CORBIN, F.T.; WARD, E.R.; FLEISCHMANN, T.J.; DEWEY, R.E. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 96, p. 1750–1755, 1999.
- SMITH, J.W.; SHEETS, T.J. Uptake, distribution, and metabolism of monuron and diuron by several plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 15, n. 4, p. 577–581, 1967.
- SOAR, C.J.; KAROTAM, J.; PRESTON, C.; POWLES, S.B. Reduced paraquat translocation in paraquat resistant *Arctotheca calendula* (L.) Levyns is a consequence of the primary resistance mechanism, not the cause. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 76, p. 91–98, 2003.

5 ENVOLVIMENTO DE GENE DA FAMÍLIA CITOCROMO P450 MONOXIGENASE NA VIA DE DESINTOXICAÇÃO DE HERBICIDAS INIBIDORES DO FSII EM CAPIM-COLCHÃO

Resumo

Entre as espécies de capim-colchão, *Digitaria nuda* apresenta tolerância a herbicidas inibidores do fotossistema II (FSII) como diuron e tebutiuron, porém isto não ocorre com ametrina e metribuzin. A base fisiológica e molecular da tolerância dessa espécie ainda não é conhecida. Uma das possíveis explicações é o envolvimento de enzimas que metabolizam as moléculas herbicidas em substâncias menos tóxicas. A família gênica de citocromo P450 monooxigenase (P450), assim como glutathione-S-transferase (GST) possuem papel primordial no processo de metabolização de herbicidas em outras espécies. Dessa forma o objetivo do estudo foi identificar e caracterizar se genes que codificam P450 e GST, por meio de PCR em tempo real, atuam na tolerância apresentada por *D. nuda* ao diuron. Sequências específicas para o gênero *Digitaria* foram identificadas para genes P450 baseado em seqüências de genes ortólogos descritas para a desintoxicação de herbicidas inibidores do FSII em diversas espécies. Análise quantitativa de transcritos em *D. nuda* (tolerante) mostrou altos níveis de expressão do gene CYP81A6 (P450) quando comparada a *D. ciliaris* (suscetível) submetidos a aplicação de diuron. Com a aplicação de ametrina, a expressão de CYP81A6 demonstrou não ser específica a herbicidas do grupo químico da fenilureias. Análise de expressão do gene GST TAU17 não diferiu entre as espécies de *D. nuda* e *D. ciliaris* para ambos os herbicidas. Esses resultados foram corroborados pela atividade específica da GST. Dessa forma, é possível sugerir o envolvimento citocromo P450 monooxigenase na metabolização do diuron em *D. nuda*, fazendo com que se torne mais tolerante a essa molécula e que parte desse fenômeno é explicado pela expressão do CYP81A6. Além disso, a GST é pouco efetiva na desintoxicação de herbicidas do grupo químico das feniluréias e triazinas.

Palavras chave: Tolerância a herbicidas; Metabolismo de herbicidas; Diuron; Ametrina

Abstract

Among the species of crabgrass, *Digitaria nuda* presents tolerance to herbicides inhibiting the photosystem II (PSII) as diuron and tebutiuron, but this does not occur with ametryn and metribuzin. The molecular and physiological basis of tolerance of this species is not yet known. One possible explanation is the involvement of enzymes that metabolize the herbicide molecules into less toxic substances. The gene family of cytochrome P450 monooxygenase (P450) and glutathione-S-transferase (GST) has a role in the process of metabolism of herbicides in other species. Thus, the objective was to identify and characterize genes that encode P450 and GST, through real-time PCR, are involved in tolerance by *D. nuda* to diuron. Specific sequences for

the genus *Digitaria* P450 genes have been identified based on sequences orthologous genes described for the detoxification of the PSII-inhibiting herbicides in several species. Quantitative analysis of transcripts in *D. nuda* (tolerant) showed high levels of expression of the gene CYP81A6 (P450) compared to *D. ciliaris* (susceptible) submitted the application of diuron. With the application of ametryn, the expression of CYP81A6 demonstrated no specific chemical groups of herbicides fenilureias. Analysis of gene expression TAU17 GST did not differ between the species *D. nuda* and *D. ciliaris* for both herbicides. These results were corroborated by the specific activity of GST. Thus, it is possible to suggest the involvement cytochrome P450 monooxygenase in metabolism of diuron in *D. nuda*, causing them to become more tolerant to this molecule and that part of this phenomenon is explained by the expression of CYP81A6. In addition, the GST is less effective in the detoxification of herbicides chemical group fenilureas and triazines.

Keywords: Herbicide tolerance; Herbicide metabolism; Diuron; Ametryn

5.1 Introdução

A tolerância de plantas daninhas a herbicidas é uma característica intrínseca da espécie em sobreviver a aplicações desses agroquímicos na dose recomendada, a qual seria letal a outras espécies, sem grandes alterações em seu desenvolvimento. Assim como a tolerância, a suscetibilidade, também apresenta essa característica. Nesse caso, porém, as alterações conferem efeitos marcantes no crescimento e desenvolvimento da planta (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). No caso das espécies de capim-colchão (*Digitaria* spp.) tem sido relatado dificuldades no controle com alguns herbicidas que inibem o transporte de elétrons no FSII (diuron e tebutiuron), onde *D. nuda* é considerada tolerante, porém a outros inibidores do FSII como a ametrina e metribuzin essa espécie é suscetível (DIAS et al., 2005). Apesar de já haver algumas alternativas de controle para solucionar o problema da tolerância diferencial das espécies de capim-colchão, a base fisiológica e molecular da tolerância de *D. nuda* ainda não está esclarecida (DIAS et al., 2007).

As plantas evitam os efeitos dos herbicidas com vários mecanismos diferentes. Esses mecanismos podem ser agrupados em duas categorias básicas: os que excluem a molécula de herbicida do local onde é induzido a resposta tóxica e os que tornam o sítio específico de ação do herbicida resistente à molécula. Vários desses mecanismos, muitas vezes agem em conjunto para produzir a resistência/tolerância como um todo na

planta. Embora seja difícil generalizar sobre as muitas espécies de plantas afetadas pelo uso de herbicidas, resistência/tolerância diferencial é principalmente ligado ao metabolismo de herbicidas, secundariamente devido ao local de mecanismos de ação e, por fim, relacionada a diferenças na interceptação e absorção (DEKKER; DUKE, 1995).

O metabolismo de herbicidas é geralmente dividido em três fases: fase I (conversão), fase II (conjugação) e fase III (compartimentação). Durante a fase I, os herbicidas sofrem modificações não sintéticas, tais como oxidação e hidroxilação que normalmente aumentam a polaridade, resultando em diminuição da fitotoxicidade da molécula original. Modificações do herbicida na fase I pode também fornecer sítios de ligação para a conjugação (fase II) de glicose, aminoácidos ou glutathione. A fase III pode envolver uma conjugação secundária, seguida pelo transporte dos conjugados xenobióticos a compartimentos, como o vacúolo e parede celular, onde o metabolismo ainda pode ocorrer (SIMINSZKY, 2006). Na fase I a família das citocromo P450 monooxigenase (P450) tem papel primordial, enquanto que na fase II quem atua é glutathione-S-transferase (GST), dependendo da molécula do herbicida a ser metabolizada (SIMINSZKY, 2006; CUMMINS et al., 1999).

A família multigênica citocromo P450 monooxigenase atua em diversas funções nas plantas como síntese de hormônios, esteróis e ácidos graxos (SCHULER et al., 2006). Outras funções, provavelmente a maioria, estão envolvidas em aspectos do metabolismo secundário que diferem entre espécies. Consequentemente, o número, a especificidade e o substrato de P450 também diferem inter especificamente. Esta é uma das razões para a seletividade diferencial de herbicidas. As P450s usam elétrons do NADPH para catalisar a ativação do oxigênio molecular. A reação catalisada é geralmente uma mono-oxigenação, com a formação de uma molécula de água e um produto oxigenado (WERCK-REICHHART et al., 2000). Em plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*, cerca de 44 famílias de genes que codificam para P450 identificados, nenhum gene está diretamente ligado com o processo de desintoxicação de herbicidas (SCHULER et al., 2006). Apesar da importância da família de P450 no processo de metabolização de herbicidas, existem alguns poucos relatos do envolvimento dessa família de genes no processo de desintoxicação de herbicidas em

plantas cultivadas. A expressão de genes que codificam P450 como CYP71A10 em soja, CYP81A6 em arroz e CYP76B1 em *Helianthus tuberosus* tem sido relacionado com a metabolização de herbicidas de diversos grupos químicos, incluindo os grupos das feniluréias como o diuron (SIMINSZKY, 2006; PAN et al., 2006; ROBINEAU et al., 1998).

Em plantas, atividade da GST protege as células de uma ampla gama de estresses bióticos e abióticos, incluindo o ataque de patógenos, a toxicidade de xenobióticos e metais pesados, além do estresse oxidativo. A atividade que melhor caracteriza a GST envolve a conjugação do tripeptídeo glutationa (GSH) a uma variedade de substratos hidrofóbicos, eletrofílicos e normalmente citotóxicos (SORANZO et al., 2004). Em plantas modelo, os genes que codificam GSTs foram identificados e caracterizados quanto a sua homologia. As plantas possuem sete classes, sendo Tau (U), Phi (F), Lambda (L), DHARs (dehidroascorbato redutase), Theta (T), Zeta (Z), TCHQD (Tetraclorohidroquinona dehalogenase). Sendo as quatro primeiras dessas classes específicas para plantas (ÖZTETIK, 2008). Genes como o *AtGSTU19* de *Arabidopsis* tem relação com metabolização de herbicidas do grupo químico das cloroacetanilidas (DERIDDER et al., 2002); *ScGSTU17*, *ScGSTU13*, *ScGSTF3* e *ScGSTF4* têm relação com a desintoxicação de diuron e ametrina em cana-de-açúcar (NISHIMURA, 2007) e *GmGSTU3* de soja com a metabolização de herbicidas como fomesafen e oxyflourfen (ANDREWS et al., 2005). Além disso, a aplicação de "safeners" que protegem algumas culturas dos efeitos dos herbicidas atuam também na expressão de genes de GST (YUAN et al., 2007).

Considerando esses aspectos, o objetivo do presente trabalho foi a identificação, caracterização fisiológica e molecular de genes que codificam P450 e GST que possam ser alvo no processo de tolerância a aplicação do herbicida diuron na espécie de capim-colchão *D. nuda*.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material vegetal

Os diásporos das espécies *D. nuda* e *D.ciliaris* foram semeados em vasos com capacidade para 1,1L contendo solo de textura média (20% argila; 77% areia; 3% silte, 48 g dm⁻³ M.O), adubados com 5 gramas de NPK na formulação 10-10-10 por vaso. Os vasos foram mantidos irrigados diariamente através de um sistema de irrigação automática, para que não ocorresse deficiência hídrica. Passados 15 dias da semeadura (DAS) foi realizado o desbaste, deixando a quantidade de cinco plantas por vaso. Durante todo o período de crescimento as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da ESALQ – USP, no município de Piracicaba, 22° 42' 29.98" S, 47° 37' 42.95" W e 546 m de altitude

Passados 23 DAS foi realizada a aplicação dos herbicidas diuron (dose equivalente a 3200 g i.a ha⁻¹), molécula que a *D. nuda* é tolerante e ametrina (dose equivalente a 4000 g i.a ha⁻¹), molécula que têm controle satisfatório para ambas as espécies de capim-colchão estudada. A aplicação ocorreu em uma câmara de aplicação, utilizando um bico de pulverização do tipo leque, com jato plano, modelo XR 80.02, calibrado para proporcionar um volume de calda de 227 L ha⁻¹. Após a aplicação os vasos foram deixados sob luz solar ambiente, fora da casa-de-vegetação. Os tratamentos foram a testemunha e a dose de cada herbicida para cada espécie de capim-colchão, perfazendo esquema fatorial (3 tratamentos x 2 espécies x 3 repetições). As amostras do tecido foliar das cinco plantas, de cada vaso, nos períodos de 3 e 6 h após a aplicação (HAA) foram imediatamente coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em -80°C para extração do RNA total. Todos os demais procedimentos foram realizados no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP.

5.2.2 Identificação de genes relacionados a P450 e desenho dos iniciadores

Para a identificação de sequências gênicas específicas de P450 das espécies estudadas, foram utilizadas sequências de aminoácidos depositadas no NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para os genes ortólogos CYP71A10 de soja (SIMINSZKY, 2006), CYP81A6 de arroz (PAN et al., 2006), CYP76B1 de *Helianthus tuberosus* (ROBENEAU et al., 1998) e CYP71R4 de *Lolium rigidum* (POWLES; YU, 2010) os quais foram descritos quanto a função na metabolização de herbicidas inibidores do FSII. Essas seqüências de proteína foram utilizadas individualmente no Gene Index DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>) usando o programa BLAST (<http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>) na identificação de seqüências consensos ou grupamentos de EST (Expressed Sequence Tags) de *Panicum virgatum*. Com os consensos identificados de *Panicum virgatum* com alta similaridade (E value $<10^{-7}$) das seqüências citadas acima foram realizados os alinhamentos com Clustal W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) para a identificação do grupamento de EST de *Panicum virgatum* de maior similaridade com o gene ortólogo respectivo. Após a identificação das seqüências específicas de P450 em *Panicum virgatum*, estas foram utilizadas para desenvolver os iniciadores com auxílio do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Baseado em seqüências de genes ortólogos de GST, Tau13, Tau17, Phi3 e Phi4, previamente identificadas e caracterizadas quanto a tolerância à herbicidas em cana-de-açúcar (NISHIMURA, 2007), os iniciadores foram testados nas espécies de *Digitaria*.

A identificação de seqüências de genes de referência seguiu o mesmo padrão descrito acima. Para esses, foram desenhados iniciadores para os genes da β -tubulina1, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e actina de *Panicum virgatum*. A qualidade dos iniciadores foi analisada com auxílio do NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>) em relação à estabilidade e eventual ocorrência de pareamento indesejável, como a formação de alças (*hairpins*), dímeros do mesmo iniciador (*primer-dimer*) e entre o par de iniciadores (*cross dimer*). Os iniciadores específicos sintetizados (Tabela 5.1) foram ressuspendidos na concentração estoque de 50 μ M em água ultrapura (Milli-Q) estéril e armazenado a -20°C .

Tabela 5.1 - Descrição dos iniciadores desenhados para o estudo da expressão de genes de P450 e GST em espécies de capim-colchão tolerante e suscetível ao diuron

Gene	Sequencia (5' - 3')	Annotator	Amplicon (pb)
CYP71A10	F: GGAAGCCGAGAGTGACTGAA R: CTAGCCTCCCTTGGCAGAA	AF022157.1	115
CYP81A6	F: GAGGTCTACACGGACACCATGA R: TTGATGATGCTCTGGAGGTAGC	DM143458.1	221
CYP76B1	F: CCCAGTCAAGGTCGAAAGAG R: GAAGGATGGTGAGGTTGGTG	Y09920.1	161
CYP71R4	F: TGTGAAGGCACTCATTTTGG R: TCATCTTCTCCAGCTCCTCCT	AB097496.1	185
ScGSTU17	F: AGGACCTCGCCAACAAGA R: TGAAGATCGGGTACAGAGCA	TC42309	240
ScGSTU13	F: GCGGAGAAGGTGAAGGAGA R: CGAACCAGAACAAGAAGGAGC	TC37214	142
ScGSTF3	F: TGGGAAGAAAGAAGGTGGTG R: GCAAATGCAAGCTGGAAGA	TC34616	114
ScGSTF4	F: CCGCCTGAGTTGACCTTTC R: CCATGCTCTTCACACAACCA	TC56926	159
β-tubulina 1	F: GGAAGATGAGCACCAAGGAAGT R: GAGTTGCCGATGAATGTGGA	TC112250	158
GAPDH	F: TGTTCCGACAGTTGATGTCTCC R: GTGGAAACCAAATCCTCCTCTG	TC112815	150
Actina	F: GCCACCATAACCACAACCTC R: GCATCGTCACCAGCAAAAC	TC52967	200

5.2.3 Extração e quantificação do RNA total

Para a extração do RNA, bem como para as etapas que se seguiram, foram tomados os devidos cuidados a manutenção da integridade do mesmo. Assim, todos os materiais utilizados foram previamente tratados com água ultrapura (Milli-Q) estéril adicionada de dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,01% e submetidos à esterilização em autoclave por 40 min a 120°C e 1 atm de pressão. Cada amostra foi macerada em nitrogênio líquido com a adição de um inibidor de compostos fenólicos no momento da maceração, o polivinilpirrolidona (PVPP) a 2% e foram transferidos cerca de 200mg do macerado para micro tubos de 2 mL. Após a maceração, adicionou-se 1 mL de

tampão de extração pré-aquecido [2 % CTAB (m/v); 100 mM Tris pH 8,0; 25 mM EDTA; 2 M NaCl; 2% β -mercaptoetanol (v/v)]. Após a homogeneização, as amostras foram colocadas em banho-maria a 65°C por 10 min e em seguida no gelo por 1 min. Adicionou-se 1 mL de cloformio:Álcool isoamílico (CIA) (24:1 v/v), seguindo-se de homogeneização e centrifugação a 13000 RPM por 10 min a 4°C. Aproximadamente 650 mL de sobrenadante foram coletados e transferidos para um novo tubo e adicionou-se o mesmo volume de CIA (24:1 v/v). Seguindo-se por centrifugação a 13000 RPM por 10 min a 4°C. Coletou-se o sobrenadante e transferiu-se para um novo microtubo e adicionou-se 0,25 vezes do volume coletado de cloreto de lítio (8 M), precipitando por 12 h a 4°C. Centrifugou-se a 13000 RPM por 30 min a 4°C, e em seguida descartou-se completamente o sobrenadante. Lavou-se o RNA com etanol 75% (água DEPC) por duas vezes e centrifugado a 10000g por 10 min a 4°C. O *pellet* foi secado a temperatura ambiente por 10 minutos e diluído em 30 μ L de água DEPC 0,01%. Todas as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

A integridade do RNA total extraído foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,2 % - tampão SB (BRODY; KERN, 2004) a 3 V cm^{-1} , aplicando-se uma alíquota de 1 μ L do RNA total de cada amostra. Para a determinação da concentração e pureza do RNA total extraído, uma alíquota de 2 μ L foi retirada para leitura da densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®) em 260 nm e razão de 260/280 nm, respectivamente. Depois da quantificação, cerca de 2 μ g do RNA extraído de cada amostra foi submetido a tratamento com a enzima DNase I (Fermentas Life Sciences®). Para tanto, seguiu-se as especificações do fabricante utilizando-se 1 U de DNase I acrescida de tampão apropriado, 2 U de RNase “out” (Invitrogen®) e água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com DEPC a 0,01% para um volume final da reação de 10 μ L. O tubo foi incubado no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) a 37°C por 30 min. Em seguida foi adicionado 1 μ L de 25 mM EDTA, incubado 65°C por 10 min e seguido a 4 °C para a inativação da enzima.

5.2.4 Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se 2 µg do RNA tratado com DNase, seguindo as especificações do kit Improm-II™ Reverse Transcriptase (Promega®), adicionado-se 500 ng do iniciador poli-T (oligo-dT 18 pb) e água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com DEPC a 0,01% para volume final de 5 µL. O RNA foi desnaturado a 70°C por 5 min e resfriado a 4°C por 5 min. Em seguida, foi adicionado 3 mM de MgCl₂; 0,5 mM de dNTPs ; 2 U de RNase “out” (Invitrogen®); 1 U da enzima Improm-II™ Reverse Transcriptase em tampão apropriado; e água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com DEPC a 0,01% para um volume final da reação de 15 µL. A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições de termociclagem: 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min; depois armazenada a -20°C.

5.2.5 Análise da identidade dos iniciadores por RT-PCR

Com o objetivo de certificar a identidade da sequência amplificada com os iniciadores dos genes de P450 e GST (Tabela 5.1) foi conduzida a reação de amplificação por PCR (*polimerase chain reaction*) no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) seguindo os parâmetros de volume total da PCR foi de 25 µL; adicionando-se 2 µL do cDNA tratado com DNase na diluição 1:10 (v:v) ; 0,2 mM de dNTPs; 0,2 µM de cada iniciador; 2 mM de MgCl₂; 1 U da enzima Taq polimerase, 10x Taq buffer com (NH₄)₂SO₄ (750 mM Tris-HCl, pH 8.8; 200mM (NH₄)₂SO₄) – (Fermentas) e água ultrapura (Mili-Q) estéril, totalizando 25 mL de reação. A termociclagem foi conduzida a 95°C por 5 min; 40 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 40 s; e 72°C a 7 min. O padrão de banda única foi obtido com visualização em gel de agarose 1,0 % - tampão SB (BRODY e KERN, 2004) a 3 V cm⁻¹.de µL do produto de PCR obtendo os fragmentos de tamanhos específicos Tabela 1

Com o restante da reação para cada iniciador específico, foi realizada a ligação do amplicom purificado no vetor de clonagem pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit (Promega) seguindo as especificações do fabricante. A ligação foi mantida a 4°C por 16

h. Após esse período, 2 μL da ligação foram transferidos para um tubo contendo 40 μL células competentes de *E. coli* DH10B. Para a eletroporação, utilizou-se um eletroporador modelo micropulser – (BioRad) e em cubetas de 0,2 mm aplicou-se um pulso de corrente elétrica de 1,8 KV por 3,4 s. Rapidamente as células foram transferidas para um tubo contendo 1 mL de meio líquido SOC (20 g L^{-1} bacto triptona, 5 g L^{-1} extrato de levedura e 0,5 g L^{-1} NaCl, 250 mM de KCl pH 7,0 e 2 M MgCl_2) e mantidas a 37°C por 1 h em agitação. O material foi centrifugado por 5 min a 2000 g sedimentando as bactérias. O sobrenadante foi então descartado e cerca de 100 mL restantes foram ressuspensos e plaqueados em meio LB sólido (Luria-Bertani, composto de 10 g L^{-1} triptona, 10 g L^{-1} NaCl e 5 g L^{-1} extrato de levedura e 15 g L^{-1} de Bactoagar) contendo 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina; adicionado de 50 μL de 100 mM IPTG (Isopropil β -D-galactopiranosídeo) e 25 μL de 120 mM X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo). As placas foram mantidas a 37°C por 17 h para o crescimento das colônias com o fragmento de interesse. As colônias brancas isoladas foram transferidas para 5 mL de meio líquido LB com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, e mantidas em agitação constante a 37°C durante aproximadamente 17 h. Após o crescimento das colônias; 1,5 mL do volume foi submetido à centrifugação por 1 min a 12.000 g a 20°C. O sobrenadante foi descartado, e esse procedimento repetido por mais uma vez para aumentar o rendimento da minipreparação (protocolo de extração de DNA plasmidial por lise alcalina).

Para a verificação do DNA plasmidial foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão SB. Após a confirmação da integridade do DNA plasmidial por eletroforese e quantificação por leitura fluorescência em um fluorímetro DyNA Quant 200 (GE Healthcare Bio Sciences), a identidade das sequências dos primers (amplicom) clonadas no vetor foram confirmadas por sequenciamento realizado pela empresa Helixxa Bases for Life (Campinas, São Paulo, Brasil).

Dos iniciadores desenhados para P450, foram obtidas seqüência específicas para CYP81A6 com fragmentos apresentando 72% de identidade, para as duas espécies de capim-colchão, com a seqüência do gene de arroz (Figura 5.1). Entre as espécies de capim-colchão, os fragmentos obtidos tiveram 98% de identidade.

```

putativeP450Panicumvirgatum      GAGGAGCGTGATCGCCGTGCTGCTCTCTCTGCAGAAAGTCGGAGCCGGAGG
CYPD.ciliaris                    -----ATTGAGG
CYPD.nuda                         -----ATTGAGG
geneCYP81A6Oryzasativa          GAAGAGCATGATCGCCGTGCTGCTCACTCTGCAGAAAGACAGAGCCGGAGG
                                     ****

putativeP450Panicumvirgatum      TCTACACGGACACCATGATCCTGTGCGCTGTGCGCGAAATTTGTTGGCGCC
CYPD.ciliaris                    TCTACACGGACACCATGATCATGTGCGCTCTGCGCGAACTTGTTGGCGCC
CYPD.nuda                         TCTACACGGACACCATGATCATGTGCGCTTTGCGCGAACTTGTTGGCGCC
geneCYP81A6Oryzasativa          TGTACACCGATAACATGATCACAGCTCTAACGGCGAACTTGTTGGAGCA
                                     * **** * * ***** . * ** : ***** ***** ** **

putativeP450Panicumvirgatum      GGGACGGAGACAACGTCGACCACGACGGAATGGGCCATGGCGCTCCTGCT
CYPD.ciliaris                    GGGACGGAGACCACATCGACCACGACGGAATGGGCCATGTGCGCTCCTGCT
CYPD.nuda                         GGGACGGAGACCACATCGACCACGACGGAATGGGCCATGTGCGCTCCTGCT
geneCYP81A6Oryzasativa          GGAACAGAGACAACCTCGACGACATCAGAATGGGCGATGTGCGTACTGCT
                                     ** ** ***** ** ***** ** . ***** ** * ** **

putativeP450Panicumvirgatum      CAACCACCCGGAGAAGCTCAAGAAGGCGCAGCCGAGATCGACGCCGCGG
CYPD.ciliaris                    GAACCACCCGGATGTGCTCAAGAAGGCGCAGCCGAGATCGACACAGCCG
CYPD.nuda                         GAACCACCCGGAGGTTCTCAAGAAGGCGTAGCCGAGATCGACACAGCCG
geneCYP81A6Oryzasativa          GAACCACCCCGACACACTCAAGAAAAGCGCAAGCCGAGATCGACGCATCCG
                                     ***** ** . ***** ** * ***** ** * **

putativeP450Panicumvirgatum      TGGGCACCTCCCGCCTCATCGCCCCGGACGACTTGGCGCGCCTCGGCTAC
CYPD.ciliaris                    TGGGCACCTCCCGCCTCATCACCCCAGACGACCTGCCACGCCTCGGCTAC
CYPD.nuda                         TGGGCACCTCCCGCCTCATCACCCCAGACGACCTGCCCGCGCCTCGGCTAC
geneCYP81A6Oryzasativa          TCGGCAACTCTCGCCTGATCACCGCCGACGAGCTGACTCGCCTCGGCTAC
                                     * **** ** ***** ** * ** * ***** ** * *****

putativeP450Panicumvirgatum      CTCCAGAGCATCATCAACGAGACGCTCCGGCTCTACCCGCGCGCGCCGCT
CYPD.ciliaris                    CTCCAGAGCATCATCAAAAATCACTAGTGAATTC-----
CYPD.nuda                         CTCCAGAGCATCATCAAAAATCGAATTCCCGCGCC-----
geneCYP81A6Oryzasativa          CTCCAGTGCATCGTCAGGGAGACGCTCCGCCTGTACCCCGCGCGCCGAT
                                     *****:*****.***. . .

```

Figura 5.1 - Alinhamento gerado pelo programa Clustal W das sequências de capim-colchão relacionada com a sequência do gene CYP81A6. A linha em vermelho representa a sequência dos iniciadores utilizados

Dos iniciadores de GST usados, relacionados com tolerância de cana-de-açúcar a herbicidas, a amplificação por PCR utilizando os iniciadores específicos para Tau17 originou fragmentos de tamanho esperado. A identidade das sequências de capim-colchão com a sequência do gene Tau17 de cana-de-açúcar é de 86%. Enquanto que entre as espécies *D. nuda* e *D. ciliaris* a identidade é de 99% (Figura 5.2).

```

Taul7D.ciliaris          -----ACCTCGCCAACAAGAGCGCCGACCTGC
Taul7D.nuda              -----ACCTCGCCAACAAGAGCGCCGACCTGC
Taul7Saccharumofficinarum CGAGTACGAGTACGTCGACGAGGACCTCGCCAACAAGAGCGCCGACCTGC
                        *****

Taul7D.ciliaris          TCCGCTACAACCCGGTGACCAAGAAGGTGCCCGTCCCTCGTCCACGACGGC
Taul7D.nuda              TCCGCTACAACCCGGTGACCAAGAAGGTGCCCGTCCCTCGTCCACGACGGC
Taul7Saccharumofficinarum TCCGCTACAACCCGGTGACCAAGAAGGTGCCCGTGCTCGTCCACGACGGC
                        *****

Taul7D.ciliaris          AAGCCTCTCGCCGAGTCCACCATCATCGTGGAGTACATCGACGAGGCCTG
Taul7D.nuda              AAGCCTCTCGCCGAGTCCACCATCATCGTGGAGTACATCGACGAGGCCTG
Taul7Saccharumofficinarum AAGCCGATCGCCGAGTCCACCATCATCGTCGAGTACATCGATGAGGTCTG
                        *****

Taul7D.ciliaris          GAAGAGCGGCTACCCCATCATGCCGTCCGATCCCTACGAGCGTGCTCAGG
Taul7D.nuda              GAAGGGCGGCTACCCCATCATGCCGGCCGATCCCTACGAGCGTGCTCAGG
Taul7Saccharumofficinarum GAAGGGCGGCTACCCCATCATGCCGGCCGACCCCTACGAGCGTGCCGAGG
                        *****

Taul7D.ciliaris          CGAGGTTCTGGGCCAGGTACGCTGAAGACAAGTGCAACCCTGCTCTGTAC
Taul7D.nuda              CGAGGTTCTGGGCCAGGTACGCTGAAGACAAGTGCAACCCTGCTCTGTAC
Taul7Saccharumofficinarum CGAGGTTCTGGGCCAGGTTCGCAGAGAGAGAGTGCACACGCTGCTCTGTAC
                        *****

Taul7D.ciliaris          CCGATCTTCAAAATCGAATTCCCGCGGCC-----
Taul7D.nuda              CCGATCTTCAAAATCGAATTCCCGCGGCC-----
Taul7Saccharumofficinarum CCGATCTTCAACCGCGACCGGCGAGGCGCAGCGCAAGGCGGTGCAGGAGGC
                        *****

```

Figura 5.2 - Alinhamento gerado pelo programa Clustal W das sequências de capim-colchão relacionada com a sequência do gene ScGSTU17. A linha em vermelho representa a sequência dos iniciadores utilizados

Dos genes referência, com os iniciadores para a β -tubulina1 foram obtidas seqüências com 83% de identidade para as duas espécies de capim-colchão em relação a sequência original acessada na base de dados *Panicum virgatum* (Figura 5.3). Entre as espécies de capim-colchão a identidade do fragmento gerado foi de 96%.

```

TUB1Panicumvirgatum CAGATGTGGGACTCCAAGAACATGATGTGTGCTGCTGACCCCTCGCCACGGCCGCTACCTC
TUB1D.nuda -----GGCCGCG-----
TUB1D.ciliaris -----GGCCGCG-----
TUB1Eleusineindica CAGATGTGGGATTCCAAGAACATGATGTGTGCTGCTGACCCCTCGTCATGGCCGCTATCTC
*****

TUB1Panicumvirgatum ACCGCATCCGCCATGTTCCGTGGGAAGATGAGCACCAAGGAAGTCGACGACGAGATGCTC
TUB1D.nuda -----GGAATTCGATTGGAAGATGAGCACCAAGGAAGTTGGACGACGAGATGCTG
TUB1D.ciliaris -----GAATTCGATTGGAAGATGAGCACCAAGGAAGTTGACGACGAGATGCTG
TUB1Eleusineindica ACAGCATCTGCCATGTTCCGTGGGAAGATGAGCACCAAGGAGGTGGATGAGCAGATGCTC
. . . ** * ***** ** ** *****

TUB1Panicumvirgatum AACGTGCAGAACAAAGAACTCATCTACTTTGTGGAGTGGATCCCCAACAAATGTCAAGTCT
TUB1D.nuda AATGTGCAGAACAAAGAACTCATCTACTTTGTGAGTGGATCCCCAACAAATGTGAAAGTCA
TUB1D.ciliaris AACGTGCAGAACAAAGAACTCGTCATACTTTGTGCGAGTGGATCCCCAACAAAGTGAAGTGC
TUB1Eleusineindica AATGTGCAGAACAAAGAACTCTTCATACTTTGTGGAATGGATCCCCAACAAACGTTAAGTGC
** ***** ** ** ***** ** ** *****

TUB1Panicumvirgatum AGCGTGTGCGACATCCCACCCAAAGGCCTGAAGATGGCATCCACATTCATCGGCAACTCG
TUB1D.nuda AGCGTGTGTGACATCCCACCCAAAGGCCTCAAGATGGCGTCCACATTCATCGGCAACTCA
TUB1D.ciliaris AGCGTGTGTGACATCCCACCCAAAGGCCTCAAGATGGCGTCCACATTCATCGGCAACTCA
TUB1Eleusineindica AGTGTGTGTGACATTCACCCAAATGGCCTGAAGATGGCGTCCACATTCATGGTAACTCT
** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ** *****

```

Figura 5.3 - Alinhamento gerado pelo programa Clustal W das sequências de capim-colchão relacionada com a sequência do gene β -tubulina 1. A linha em vermelho representa a sequência dos iniciadores utilizados

Com os iniciadores que amplificaram, foi realizado o cálculo de eficiência dos iniciadores na reação de PCR em tempo real, com um pool de cDNA de *D. nuda* e *D. ciliaris*. A eficiência do iniciador desenhado para CYP81A foi de 1,99; o Tau17 foi de 1,97 e da β -tubulina 1 de 2,1. A eficiência de amplificação (E) pode ser definida como percentagem (0 a 100%) ou como o tempo do aumento de produtos de PCR por ciclo (1 a 2) (YUAN et al., 2006). Dessa forma, fica evidenciado que os iniciadores foram ideais para quantificação da expressão em PCR em tempo real. Outro fato importante para o estudo foi que o gene referência (β -tubulina 1) amplificado apresentou estabilidade, sem variações quantitativas, para as condições impostas no ensaio, ou seja, na presença dos dois herbicidas (ametrina e diuron) quanto na ausência dos mesmos nas duas espécies de capim-colchão (dados não mostrados). Pois de acordo com Hugget et al. (2005), o gene referência a ser utilizado em medidas quantitativas de expressão de genes como é caso do PCR em tempo real, deve ser testado em condições específicas, avaliando o objetivo da aplicação.

5.2.6 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo

As análises quantitativa de transcritos (qRT PCR) foram realizadas foram conduzidas empregando SYBR Green® (Molecular Beacons) no sistema de Rotor-Gene Q (Qiagen). A reação de amplificação foi realizada num volume final de 10 µL, contendo 1 µL do cDNA diluído 1:10 (v/v); 0,5 µM de cada iniciador; 5 µl de Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG 2X (Invitrogen); e água ultrapura (Milli-Q) estéril. As amplificações foram conduzidas em incubações iniciais de 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15s, 61°C por 15s e 72°C por 30s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após o término dos ciclos de reações, foram determinadas as curvas de dissociação de cada produto amplificado entre 72°C e 95°C (curva de melting). Todos ensaios de RT-qPCR incluíram amostras em triplicatas; controle negativo (água ultrapura estéril como DNA molde) em duplicatas e o estabelecimento de curva padrão, com respectivo cálculo da eficiência da reação para cada iniciador utilizado, composta de triplicatas das diluições seriais (1, 10⁻¹, 10⁻²) do pool de cDNA das amostras das duas espécies estudadas.

5.2.7 Cálculo da expressão relativa

A expressão relativa dos genes que amplificaram foi calculada de acordo com o modelo proposto por Pfaffl (2001), com a eq. (5.1):

$$\text{Expressão relativa} = \frac{E_{\text{alvo}}^{\Delta Ct_{\text{alvo}}(\text{controle-amostra})}}{E_{\text{referência}}^{\Delta Ct_{\text{referência}}(\text{controle-amostra})}} \quad (5.1)$$

A expressão relativa de um gene-alvo é expressa em uma amostra contra um controle (ex. testemunha sem aplicação de herbicidas) em comparação com um gene de referência. E_{alvo} é a eficiência da PCR em tempo real do gene alvo transcrito. $E_{\text{referência}}$ é a eficiência da PCR em tempo real do gene referência transcrito. ΔCt_{alvo} é o desvio de Ct do controle - amostra do genes-alvo. $\Delta Ct_{\text{referência}}$ é o desvio de Ct do controle -

amostra do gene-referência. O gene de referência pode ser um gene que seja transcrito de forma estável em várias condições impostas.

5.2.8 Atividade específica da GST

Extratos da parte aérea das plantas de capim-colchão foram obtidos de acordo com Cataneo et al. (2003). Tecido foliar (~ 300 mg) foi congelado em nitrogênio líquido e terreno para um pó fino num almofariz. Os tecidos solo foram, então, homogeneizado em três vezes o volume de uma tampão de extração gelado [50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM de GSH, 0,1 mM de fluoreto fenilmetilsulfonil (PMSF), 10% (v/v) de glicerol, e 10% de polivinil-polipirrolidona (PVPP) (p/v)] e centrifugado a 8.000 g a 4 ° C por 30 min. Amostras do sobrenadante foram utilizadas para determinar a concentração de proteína e atividade da GST.

A atividade de GST em extratos solúveis de capim-colchão foi determinada utilizando o método descrito por Wu et al. (1996) com pequenas modificações. Reações continha 25 mL de extrato bruto, 5 mM de GSH, e 1 mM CDNB (1-cloro-2-4-dinitrobenzeno) em tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 6,5) em um volume final de 1 mL. Reações foram incubadas a 30 ° C e a variação da absorbância foi medida por 10 min a 340 nm. Atividade específica foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de $9,6 \text{ mM cm}^{-1}$ (HABIG; JAKOBY, 1981), corrigido para a conjugação GS-CDNB espontânea. A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando albumina soro bovina como padrão.

5.2.9 Análise estatística

Os dados de expressão relativa dos genes e atividade específica de GST foram submetidos a análise de variância. E se constado diferenças significativas, foram submetidos ao Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre as espécies tolerante (*D. nuda*) com a suscetível (*D. ciliaris*) dentro de cada condição imposta e entre os horários de avaliação.

5.3 Resultados e Discussão

Os herbicidas inibidores do fotossistema II (FSII) podem ser divididos basicamente em duas superfamílias: a família da uréia/triazina e a família dos fenólicos (HOLT et al., 1993). Os herbicidas da família das triazinas (atrazina, simazina e ametrina) e fenilurea (diuron), bloqueiam a transferência de elétrons do doador de elétron, Q_A , para o carreador móvel de elétron, Q_B . Isto acontece no sítio de ligação da plastoquinona (PQ) na proteína D1 do centro de reação do FSII. As moléculas que se ligam a proteína D1 e inibem o transporte de elétron, levam a duas principais conseqüências: i) escassez de NADPH, que é necessário para a fase de redução do ciclo de Calvin; ii) formação de radicais livres (H_2O_2 , OH^- , Cl^3) que causam a fotoxidação de moléculas importantes como: pigmentos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, causando danos as membranas e inativação de enzimas (DEVINE; SHUKLA, 2000; ALLA et al., 2008). A família da P450 monooxigenase tem sido relacionada com a metabolização de vários herbicidas em plantas superiores (SIMINSZKY, 2006).

Com o objetivo de verificar se a tolerância à aplicação de herbicida pode estar relacionada a uma expressão diferencial do gene da família P450 CYP81A6, as espécies de capim-colchão estudadas foram submetidas aplicação de diuron. Análise quantitativa de transcritos foi realizada na espécie tolerante (*D. nuda*) e suscetível (*D. ciliaris*) após 3 e 6 h da aplicação do herbicida. A expressão relativa do gene CYP81A6 entre as espécies não diferiu com 3HAA do diuron, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Porém às 6HAA, a expressão do CYP81A6 em *D. nuda* (tolerante) alcançou níveis de expressão cinco vezes maior que *D. ciliaris* (suscetível) (Figura 5.4a). Os altos níveis de expressão do CYP81A6 em *D. nuda* pode ser um indicativo da maior tolerância ao herbicida diuron (DIAS et al., 2007).

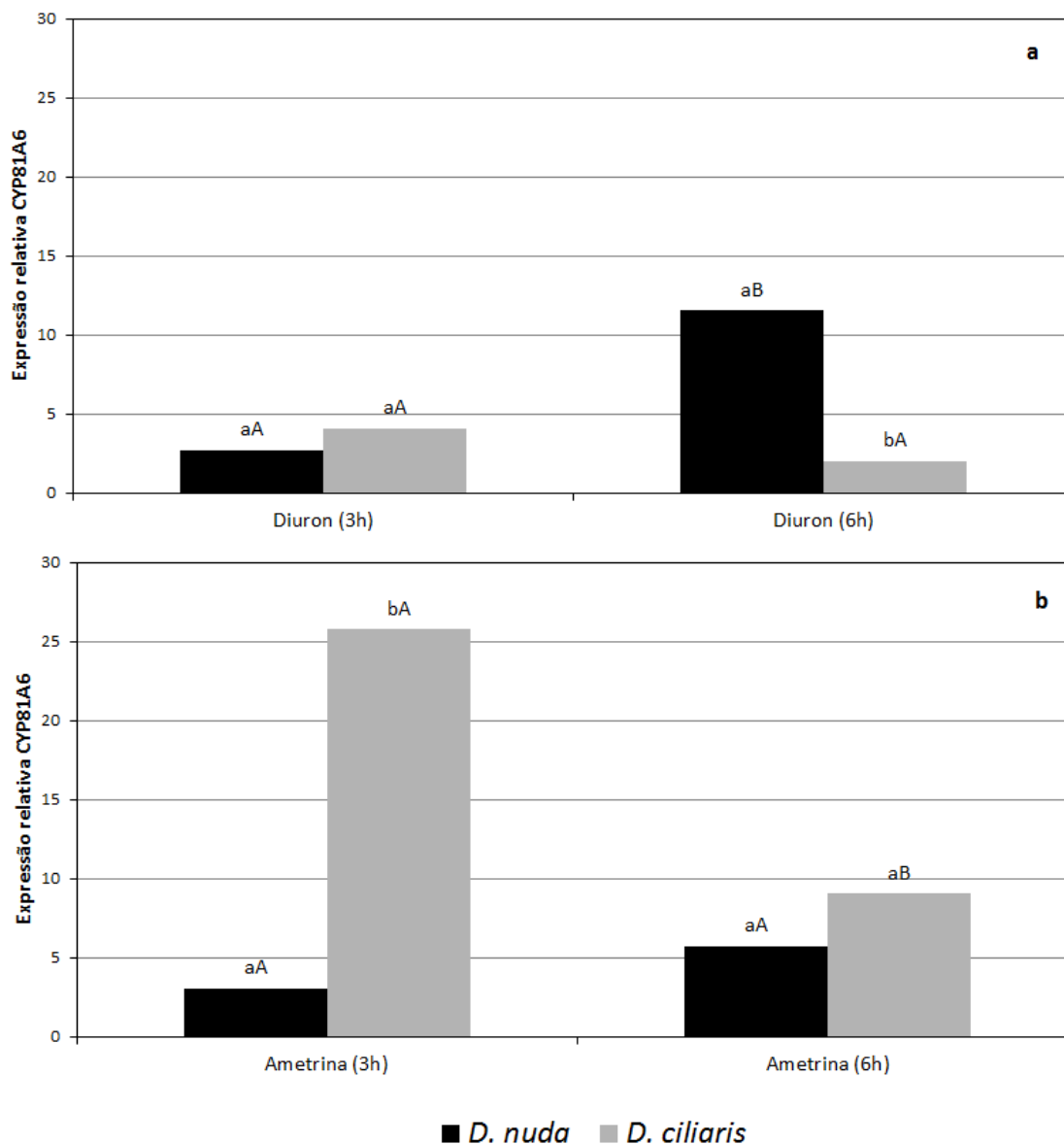


Figura 5.4 - Expressão relativa do CYP81A6 em plantas de capim-colchão após aplicação de diuron (A) e ametrina(B). Médias seguidas de mesma letra minúscula no mesmo tempo e maiúsculas em tempos distintos, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Para verificar se a maior expressão de CYP81A6 pode ser específica do grupo químico da fenilureias, ambas as espécies foram submetidas aplicação de ametrina. Quando comparada a espécie *D. nuda*, a expressão de CYP81A6 foi estatisticamente maior em *D. ciliaris* em 3 HAA de ametrina, sendo oito vezes maior neste ultimo (Figura 5.4b). Porém essa diferença não se manteve 6HAA (Figura 5.4b). Com base nas curvas

de dose resposta para aplicação de ametrina, ambas as espécies apresentaram comportamento semelhante, apresentando suscetibilidade à molécula (Figura 2.3). Os altos níveis de expressão de P450 em *D. ciliaris* com a aplicação de ametrina sugerem que a atuação da fase I para herbicidas do grupo químico das triazinas é pouco eficiente no processo de metabolização desse herbicida. Considerando esses resultados é possível sugerir que o gene da família P450 CYP81A6 possui expressão diferencial nas espécies estudadas de capim-colchão, dependendo do herbicida utilizado (Figura 5.4a e 5.4b). No caso do diuron a transformação mais comum induzida pela P450 é a N-desmetilação da molécula (SIMINSZKY et al., 1999). Em outras moléculas também pertencentes ao mesmo grupo químico do diuron (feniluréias) como o linuron, a transformação da molécula original em N-desmetil linuron é capaz de reduzir em 10 vezes a fitotoxicidade, devido a inibição da quebra da água nas reações de Hill. Além disso, a metabolização por P450 em feniluréias pode levar a conjugação dessas moléculas com glicose (SIMINSZKY et al., 1999).

Com o objetivo de identificar se a tolerância a diuron associada à espécie *D. nuda* é exclusivamente dependente da fase I ou se ainda esta ligada a fase II na qual GST faz parte do processo de conjugação de herbicida foi avaliado a expressão do gene Tau17. As GSTs são uma família de enzimas que catalisam a conjugação de diversos substratos para o tripeptídeo glutationa (GSH, g-Glu-Cys-Gly) e têm sido relacionada na fase-II metabolismo de herbicidas, incluindo atrazine, alachlor, metolachlor e fluorodifen (READE et al., 2004). E em plantas as principais classes que usam GSH nas reações substituição/adição para metabolização de herbicidas são a Phi e a Tau (EDWARDS; DIXON, 2000). Em cana-de-açúcar, a expressão do Tau 17 é induzido pela aplicação de diuron e ametrina em variedades cana-de-açúcar, na qual a variedade tolerante apresentou níveis de expressão dessa GST superiores a variedade suscetível (NISHIMURA, 2007). Quando submetidos à aplicação do diuron ambas as espécies, *D. nuda* e *D. ciliaris*, induziram a expressão do gene Tau17 significativamente com 3 e 6HAA, porém não houve diferenças na expressão do gene entre as espécies (Figura 5.5a), o que indica que a GST possivelmente não atue na conjugação de diuron. Com a aplicação do herbicida ametrina, resultados similares de expressão de Tau17 foram obtidos, contudo para esse herbicida, foi detectado maior quantidade transcritos

acumulados quando comparado ao diuron, indicando que ametrina possivelmente induz maior expressão de GST do que o herbicida diuron (Figura 5.5B).

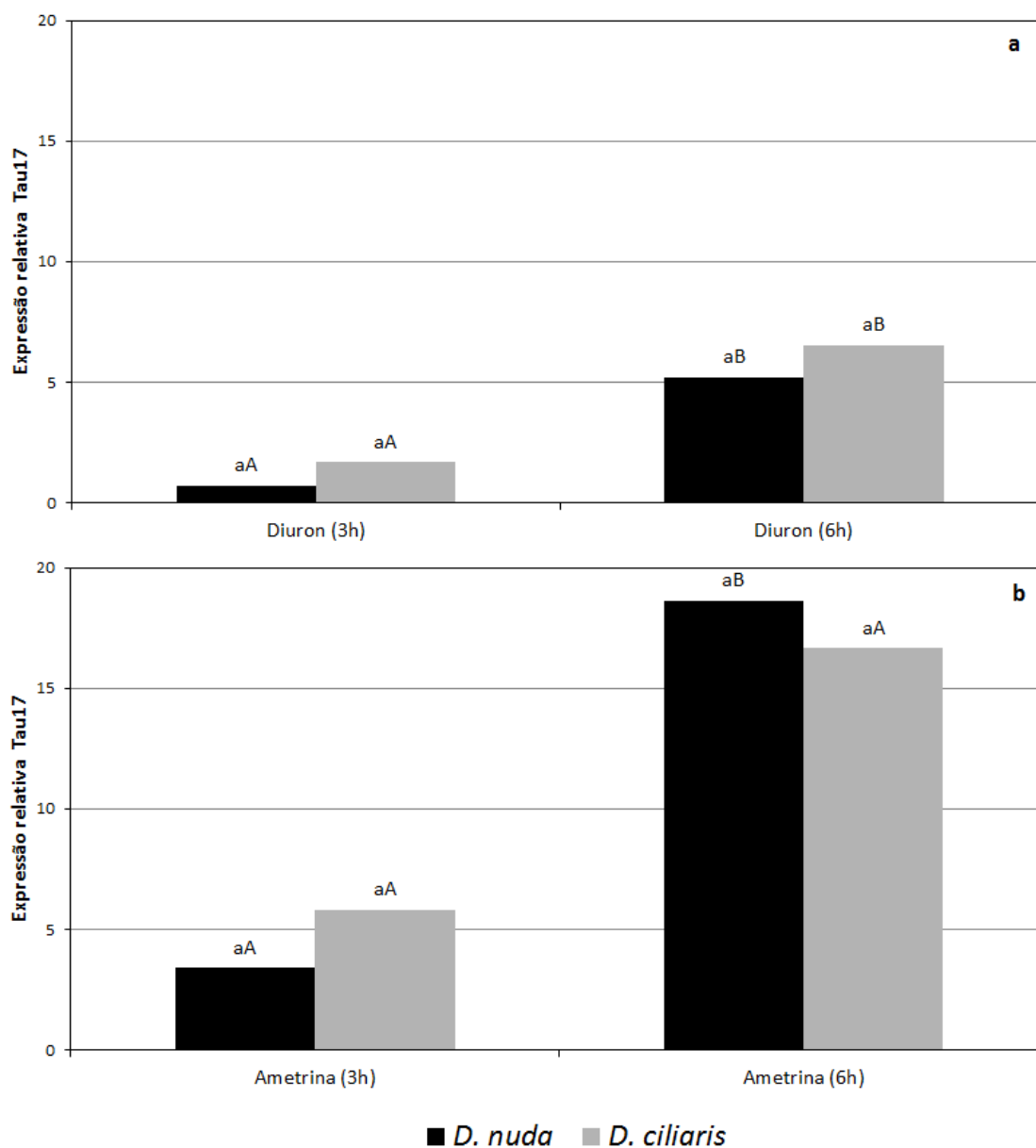


Figura 5.5 - Expressão relativa do Tau17 em plantas de capim-colchão após aplicação de diuron (A) e ametrina(B). Médias seguidas de mesma letra minúscula no mesmo tempo e maiúsculas em tempos distintos, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Considerando a possibilidade de que outro membro da família de genes GST possivelmente pode estar envolvida no processo de detoxicação, a atividade específica da GST foi quantificada nas espécies submetidas a aplicação de ambos os herbicidas. As espécies *D. nuda* e *D. ciliaris* apresentam atividade específica similares de GST independentemente do herbicida aplicado (Figura 5.6). Com base nesses resultados e nos níveis de expressão de Tau17 é possível sugerir que para gênero *Digitaria* a expressão e atividade de GST são pouco efetivas na desintoxicação de herbicidas do grupo químico das fenilureas e triazinas. A maior atividade da GST e GPX (glutathione peroxidase) nas plantas tolerantes foi relacionada a aplicação pretilachlor (cloroacetamidas), porém para metribuzin houve menor atividade dessas enzimas, o que indica que a GST é pouco efetiva na degradação de herbicidas triazinas em milho (ALLA et al., 2008). A expressão de genes de P450 também está relacionada com a metabolização de herbicidas do grupo químico das feniluréias em outras espécies de plantas como em soja, onde o gene CYP71A10 expresso em tabaco aumentou o metabolismo dos herbicidas diuron, linuron, fluometuron e chlortoluron (SIMINSZKY et al., 1999, 2000).

Estudos futuros sobre o metabolismo de diuron em *D. nuda* devem ser realizados, investigando também o envolvimento das glicosiltransferases, que atuam na conjugação de moléculas de açúcar com xenobióticos. (YUAN et al., 2007). Além disso, os estudos devem incluir inibidores específicos de P450 como tetraclorociclopentadieno, piperonyl butoxide e 1-aminobenzotriazole (FERHATOGLU et al., 2005) para identificação de outros genes de P450 que possam estar envolvidos com o processo de metabolização de herbicidas.

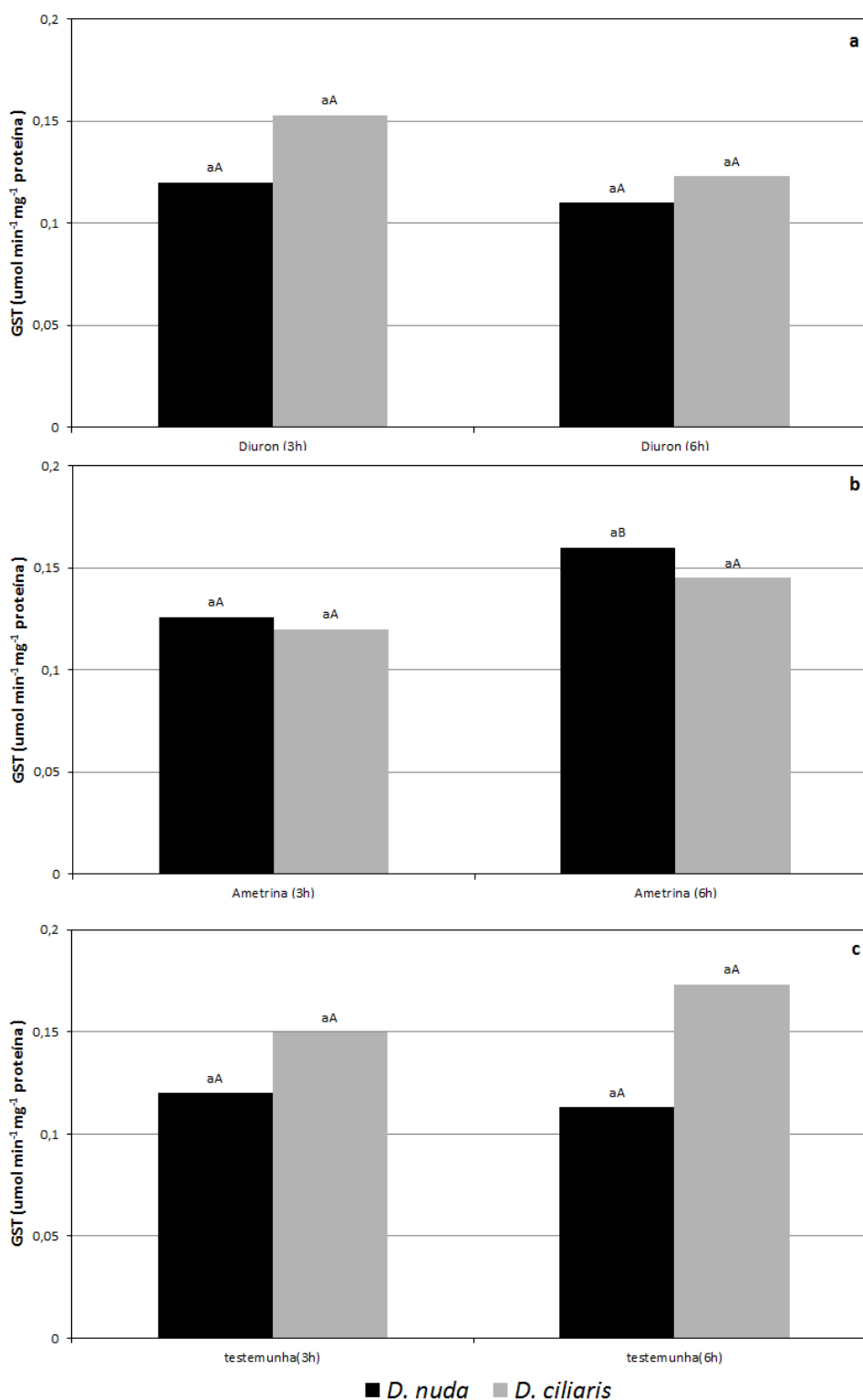


Figura 5.6 - Atividade específica da GST em plantas de capim-colchão após aplicação de herbicidas inibidores do FSII. Médias seguidas de mesma letra minúscula no mesmo tempo e maiúsculas em tempos distintos, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

5.4 Conclusões

A citocromo P450 monooxigenase participa no processo de metabolização de diuron em plantas de capim-colchão e que a maior tolerância de *D. nuda* é devido a maior expressão do gene CYP81A6. Além disso, a expressão e atividade de GST no gênero *Digitaria* parece não estar relacionada à menor suscetibilidade apresentado por *D. nuda*, indicando que o citocromo P450 monooxigenase é fundamental no processo de desintoxicação de herbicidas do grupo químico das feniluréias.

Referências

- ALLA, M.M.; BADAWI, A.M.; HASSAN, N.M.; EL-BATASWISY, Z.M.; BADRAN, E.G. Herbicide tolerance in maize is related to increased levels of glutathione and glutathione-associated enzymes. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 30, p. 371–379, 2008.
- ANDREWS, C.J.; CUMMINS, I.; SKIPSEY, M.; GRUNDY, N.M.; JEPSON, I.; TOWNSON, J.; EDWARDS, R. Purification and characterization of a family of glutathione transferases with roles in herbicide detoxification in soybean (*Glycine max* L.); selective enhancement by herbicides and herbicide safeners. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 82 p. 205–219, 2005.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.
- CATANEO, A.C.; DÉSTRO, G.F.G.; FERREIRA, L.C.; CHAMMA, K.L.; SOUZA, D.C.F. Glutathione S-transferase activity on the degradation of the herbicide glyphosate in maize (*Zea mays*) plants. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, p. 307-312, 2003.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Ed.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Piracicaba: HRAC, 2008. p. 9-34.
- CUMMINS, J.; COLE, D.J.; EDWARDS, R. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 285-292, 1999.

DEKKER, J.; DUKE, O.S. Herbicide resistant field crop. **Advances in Agronomy**, New York, v. 54, p. 69-116, 1995.

DERIDDER, B.P.; DIXON, D.P.; BEUSSMAN, D.J.; EDWARDS, R.; GOLDSBROUGH, P.B. Induction of glutathione S-transferases in arabidopsis by herbicide safeners. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1497–1505, 2002.

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

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

DIAS, N.M.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; TORNISIELO, V.L. Identificação taxonômica de espécies de capim-colchão infestantes da cultura da cana-de-açúcar no estado de São Paulo e eficácia de herbicidas no controle de *Digitaria nuda*. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 389-396, 2005.

EDWARDS, R.; DIXON, D.P. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. In: COBB, A.H.; KIRKWOOD, R.C. (Ed.). **Herbicides and their mechanisms of action**. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2000. p. 38-71.

FERHATOGLU, Y.; AVDIUSHKO, S.; BARRETT, M. The basis for the safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 81, p. 59–70, 2005.

HABIG, W.H.; JAKOBYW, W.B. Assay for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 77, p. 398-405, 1981.

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

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, Houndmills, v. 6, p. 279–284, 2005.

NISHIMURA, D.S. **Caracterização molecular da glutathione S-transferase de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) em respostas a aplicação de herbicidas**. 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ÖZTETIK, E. A tale of plant glutathione S-transferases: since 1970. **Botanical Review**, Bronx, v. 74, n. 3, p. 419–437, 2008.

PAN, G.; ZHANG, X.; LIU, K.; ZHANG, J.; WU, X.; ZHU, J.; TU, J. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene CYP81A6 that confers resistance to two different classes of herbicides. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, p. 933–943, 2006.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 317-347, 2010.

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

ROBINEAU, T.; BATARD, Y.; NEDELKINA, S.; CABELLO-HURTADO, F.; LERET, M.; SOROKINE, O.; DIDIERJEAN, L.; WERCK-REICHHART, D. The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, p. 1049–1056, 1998.

SCHULER, M.A.; DUAN, H.; BILGIN, M.; ALI, S. Arabidopsis cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. **Phytochemistry Review**, Leiden, v. 5, p. 205–237, 2006.

SIMINSZKY, B. Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. **Phytochemistry Review**, Leiden, v. 5, p. 445–458, 2006.

SIMINSZKY, B.; SHELDON, B.S.; CORBIN, F.T.; DEWEY, R.E. A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71 A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*. **Weed Science**, Lawrence, v.48, p.291-295, 2000.

SIMINSZKY, B.; CORBIN, F.T.; WARD, E.R.; FLEISCHMANN, T.J.; DEWEY, R.E. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 1750–1755, 1999.

SORANZO, N.; GORLA, M.S.; MIZZI, L.; DE TOMA, G.; FROVA, C. Organization and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 271, p. 511–521, 2004.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, Killington, v. 5, n. 3, p. 116-122, 2000.

WU, J.; OMOKAWA, H.; HATZIOS, K.K. Glutathione S-transferase activity in unsafened and fenclorim-safened rice (*Oryza sativa*). **Pesticide Biochemistry Physiology**, New York, v. 54, p. 220-229, 1996.

YUAN, J.S.; TRANEL, P.J.; STEWART JUNIOR, C.N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

YUAN, J.S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART JUNIOR, C.N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, London, v. 7, p. 1-12, 2006.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tolerância de *D. nuda* a alguns herbicidas inibidores do FSII utilizados na cultura da cana-de-açúcar foi confirmada no presente estudo com a mistura de diuron+hexazinona. Esse fato aponta que as características químicas das moléculas que inibem o fluxo de elétrons no FSII influenciam diretamente na tolerância apresentada por *D. nuda*. Uma vez que a forma com que esses se ligam ao sítio de ação podem ser diferentes ou por conta que absorção, translocação e metabolização de alguns desses herbicidas pode ser mais eficiente. Isso fica evidente, pois a ametrina controla de forma semelhante tanto a espécie de capim-colchão tolerante ao diuron quanto a espécie suscetível.

Essa tolerância é acompanhada de algumas diferenças fisiológicas em relação a outras espécies de capim-colchão como *D. ciliaris*. Primeiramente a taxa de crescimento e acúmulo de matéria seca de *D. nuda* é menor que *D. ciliaris*, o que indica menor capacidade de captação dos recursos do ambiente. Isso explica em parte o fato que a espécie tolerante é frequente apenas onde há a pressão de seleção dos herbicidas, como é caso dos canaviais com vários anos de aplicações de herbicidas inibidores do FSII como o diuron. A segunda diferença é que *D. nuda* absorve menor quantidade do herbicida diuron nas primeiras horas após aplicação contribuindo para tolerância dessa espécie, evitando que o herbicida não alcance o local de ação. E por fim *D. nuda* apresenta diferença no metabolismo de diuron pelo maior nível expressão do gene CYP81A6 que codifica P450 em relação a *D. ciliaris*. Isso pode proporcionar modificações na molécula do herbicida que reduzem a toxicidade e/ou permite que o herbicida possa ser conjugado com outros compostos como glicose para posterior transporte para o vacúolo nas células.

O presente estudo abre perspectivas de maior aprofundamento na tolerância de *D. nuda*, principalmente em relação ao metabolismo de outras moléculas que atuam inibindo o fluxo de elétrons no FSII, principalmente do grupo químico das feniluréias e triazinonas. Os estudos futuros devem contemplar o envolvimento de mais genes de P450 e das glicosiltransferases na tolerância de *D. nuda*.