

EXSUDAÇÃO RADICULAR DE IMAZAPYR E A SUA INTERAÇÃO
COM UM ANÁLOGO DE BRASSINOSTERÓIDE, EM MUDAS DE
EUCALIPTO

CARLOS MAGNO MAGALHÃES DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2006

EXSUDAÇÃO RADICULAR DE IMAZAPYR E A SUA INTERAÇÃO
COM UM ANÁLOGO DE BRASSINOSTERÓIDE, EM MUDAS DE
EUCALIPTO

CARLOS MAGNO MAGALHÃES DA SILVA

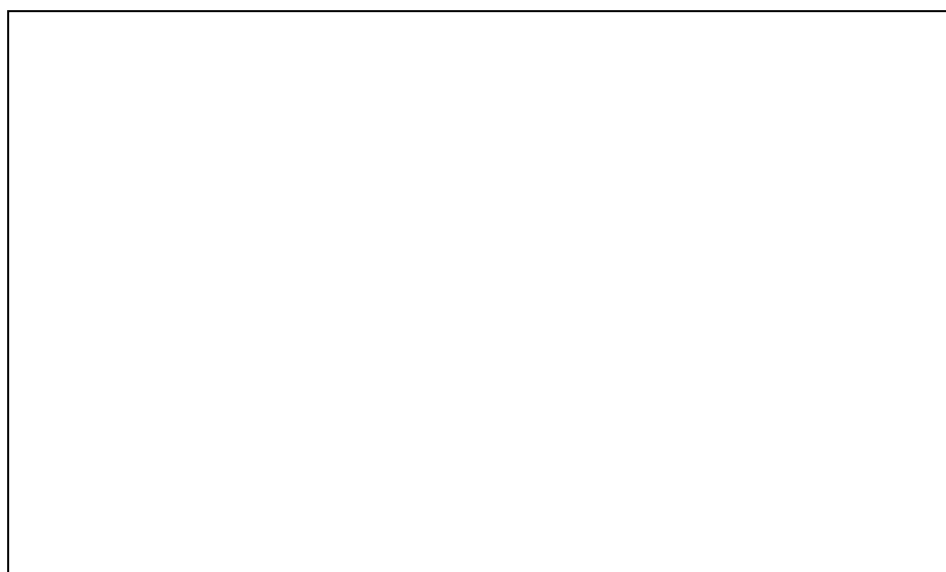
“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Silvério de Paiva Freitas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 035/2003

A large empty rectangular box with a thin black border, occupying the lower half of the page. It is intended for the entry of cataloging information.

EXSUDAÇÃO RADICULAR DE IMAZAPYR E A SUA INTERAÇÃO
COM UM ANÁLOGO DE BRASSINOSTERÓIDE, EM MUDAS DE
EUCALIPTO

CARLOS MAGNO MAGALHÃES DA SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 20 de fevereiro de 2006.

Comissão examinadora

Prof. José Geraldo de Araújo Carneiro (D.Sc. Ciências Naturais) - UENF

Prof^a. Mara de Menezes de Assis Gomes (D.Sc. Biologia Vegetal) - FAETEC

Prof. Francisco Affonso Ferreira (D.Sc. Fitotecnia) - UFV

Prof. Silvério de Paiva Freitas (D.Sc. Fitotecnia) - UENF
Orientador

“A vida é uma grande universidade, mas pouco ensina a quem não sabe ser um aluno. Devemos ser eternos aprendizes.”
(Augusto Jorge Cury)

A Deus, porque ele é antes de todas as coisas, e todas as coisas subsistem por ele (Colossenses 1.17).

Aos meus pais Carlos Roberto e Lianira.

Aos meus irmãos Sílvia Letícia, Jonatas e Roberta.

À Letícia, que, com seu amor, carinho e compreensão, me deu alento nos momentos difíceis e força necessária para realizar este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

Aos brasileiros que pagam seus impostos, mantendo as instituições de ensino e pesquisa;

À UENF e ao LFIT, pela oportunidade de realizar este trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro na concessão da bolsa;

Ao Prof. Silvério de Paiva Freitas, pela oportunidade de cursar o doutorado sob sua orientação;

Aos professores José Geraldo de Araújo Carneiro, Mara de Menezes de Assis Gomes e Francisco Affonso Ferreira, pelas valiosas colaborações na correção da Tese;

Aos professores Deborah Guerra Barroso, Eliemar Campostrini, Fábio Lopes Olivares, José Tarcísio Lima Thiebaut, Olga Lima Tavares Machado, Pedro Henrique Monnerat, pelos conhecimentos passados através das disciplinas que ministram;

Aos técnicos Luiz Maurício (Setor de Plantas Daninhas e Medicinais) e José Acáccio (Setor de Nutrição Mineral de Plantas), pela amizade e valioso apoio;

À professora e pesquisadora Miriam Nuñez-Vázquez, do Departamento de Fisiologia e Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciências Agrícolas (INCA), por ceder o análogo espirostâmico da castasterona;

Ao doutorando Reginaldo G. Mafia, do Departamento de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, por intermediar a aquisição de mudas de eucalipto junto a CAF Florestal Ltda, a quem também agradeço;

Aos amigos do Setor de Plantas Daninhas e Medicinais: Anderson Ramos, Anselmo de Deus, Bruno Cereja, Maria Célia Aroucha, Cláudia Prins, Glória Cristina, Jader.

Aos amigos e colaboradores do CCTA, em especial Wellington, Rafael, Tiago Massi e Luciane do Nascimento, pela ajuda valiosíssima nas análises dos experimentos;

A Ricardo A. Silva, pela valiosa ajuda na preparação e análise das micrografias;

Aos meus valiosíssimos amigos Ana Paula, Juarez, Kennia, Luiz Augusto e Marcelo, pelo agradável convívio e dedicação;

A todos os colegas do curso com quem tive oportunidade de trocar idéias na busca de novos conhecimentos;

Enfim, a todas as pessoas aqui não citadas, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Sumário	vi
Resumo.....	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
Referências bibliográficas.....	3
2. Revisão de literatura.....	4
2.1. Glyphosate e imazapyr no controle de brotações em eucaliptais.....	4
2.2. Exsudação radicular	6
2.3. Brassinosteróides.....	7
Referências bibliográficas.....	9
3. Trabalhos.....	13
3.1. DANOS ULTRAESTRUTURAIS EM MUDAS DE <i>Eucalyptus grandis</i> DECORRENTES DA APLICAÇÃO DE IMAZAPYR.....	13
Resumo.....	13
Abstract	14
Introdução	15
Material e métodos.....	17
Resultados e discussão	19
Conclusões	25
Referências bibliográficas.....	26

3.2. INTERAÇÃO IMAZAPYR E UM ANÁLOGO DE BRASSINOSTERÓIDE EM MUDAS DE <i>Eucalyptus grandis</i>	30
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Material e métodos.....	33
Resultados e discussão.....	35
Conclusões.....	41
Referências bibliográficas.....	42
3.3. INTERFERÊNCIA DOS HERBICIDAS GLYPHOSATE E IMAZAPYR, ASSOCIADOS A UM ANÁLOGO DE BRASSINOSTERÓIDE, NO APARATO FOTOSSINTÉTICO DE MUDAS DE <i>Eucalyptus grandis</i>	46
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e métodos.....	49
Resultados e discussão.....	51
Conclusões.....	57
Referências bibliográficas.....	60
4. Resumos e conclusões.....	64
Apêndice.....	66

RESUMO

SILVA, Carlos Magno Magalhães da, Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense, fevereiro de 2006. Exsudação radicular de imazapyr e a sua interação com um análogo de brassinosteróide, em mudas de eucalipto. Professor Orientador: Silvério de Paiva Freitas. Professora Conselheira: Mara de Menezes de Assis Gomes.

Foram realizados três experimentos em casa de vegetação, com os objetivos de avaliar os efeitos da exsudação radicular de imazapyr por *Eucalyptus grandis*, identificar alterações celulares em função da presença deste herbicida e verificar a possível interação entre os herbicidas utilizados no controle de brotações em eucaliptais com um análogo de brassinosteróide. As mudas-controle e as que receberam a aplicação de imazapyr (1,500 kg ha⁻¹), 15 dias após a sua utilização, foram retiradas da solução e, em seus respectivos lugares, foi transplantada uma muda do mesmo clone por vaso, constituindo-se o bioindicador (BIO) dos efeitos da exsudação radicular. A avaliação da interferência dos exsudados sobre o crescimento das mudas foi realizada 60 dias após o transplante dos BIOS. Além disso, foram coletadas amostras das gemas apicais de ramos para análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão às 72 horas após o transplante dos BIOS. Os exsudados radiculares das mudas submetidas à aplicação de imazapyr causaram alterações significativas em todas as variáveis estudadas, sendo que os BIOS apresentaram mudanças ultraestruturais nas células, tais como: aumento do número de células mesofílicas deformadas, cloroplastos com pequena quantidade de tilacóides,

distorção de cristas da matriz mitocondrial, vacuolização do citoplasma e rompimento de parede celular devido a alterações no sistema de endomembranas. Para a avaliação da interação do análogo de brassinosteróide (BB16) com imazapyr, foram realizados dois ensaios, sendo que no primeiro utilizou-se somente o herbicida imazapyr ($0,750 \text{ kg ha}^{-1} \text{ i.a.}$) aplicado imediatamente após BB16 ($0,08$ e $0,16 \text{ mg L}^{-1}$), ou antes da aplicação deste. No segundo ensaio, foram realizadas as aplicações de imazapyr ($0,750 \text{ kg ha}^{-1} \text{ i.a.}$) e de glyphosate ($1,440 \text{ kg ha}^{-1} \text{ i.a.}$), sendo estes produtos aplicados no intervalo de 12 horas após a aplicação de BB16 ($0,08$ e $0,16 \text{ mg L}^{-1}$), ou anterior a esta. Sob estas condições, foi verificado que a aplicação de BB16, imediatamente após a de imazapyr, conferiu tolerância às mudas aos efeitos tóxicos do herbicida; no entanto, este não proporcionou a proteção esperada quando aplicado 12 horas antes de BB16. Além disso, foi verificado que os herbicidas causaram efeitos deletérios ao aparato fotossintético das mudas de eucalipto, ademais a presença de glyphosate resultou em menor tempo para expressão destes efeitos.

ABSTRACT

SILVA, Carlos Magno Magalhães da, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense, February 2006. Root exudation of imazapyr and its interaction with a brassinosteroid analogue in eucalypt seedlings. Adviser: Silvério de Paiva Freitas. Counselor: Mara de Menezes de Assis Gomes.

It was carried out three experiments in greenhouse with the aims of evaluating the effects of imazapyr root exudation for *Eucalyptus grandis*, identifying the cellular modifications in relation to the herbicide present in the seedlings, and verifying the possible interaction between herbicides used in the stump sprouting in eucalypt crops with the brassinosteroid analogue. The seedling-control and those that received the imazapyr (1.500 kg ha^{-1}), 15 days after treatment application, were removed from the solution and, in their respective places was transplanted one seedling/vase of the same clone, which constituted the bioindicator of the effects of the root exudation. The exudate interference evaluation over the seedling growth was carried out 60 days after bioindicator transplanting. Besides, samples of the terminal bud of branches were collected to

ultrastructural analysis by transmission electron microscopy at 72 hours after the bioindicators transplanting. The root exudates of eucalypt seedlings submitted to herbicide application in the aerial part caused significant alterations in all variables analyzed, and the bioindicators showed ultrastructural changes in the cells, such as: increase of the number of irregular shaped mesophyll cells, chloroplast with small quantity of thylakoid, distortion of cristae of the mitochondrial matrix, vacuolization of the cytoplasm, and rupture of cell wall due to disorder of the endomembrane systems. Two assays were carried out for the evaluation of the brassinosteroid analogue (BB16) interaction with imazapyr. In the first assay, it was used only the imazapyr herbicide ($0.750 \text{ kg ha}^{-1} \text{ a.i.}$) applied immediately after BB16 (0.08 and 0.16 mg L^{-1}) or before the application of this analogue. In the second assay, it was carried out the applications of imazapyr ($0.750 \text{ kg ha}^{-1} \text{ a.i.}$) and glyphosate ($1.440 \text{ kg ha}^{-1} \text{ a.i.}$), applied in the period of 12 hours after the BB16 (0.08 and 0.16 mg L^{-1}), or before the application of this analogue. Under these conditions it was verified that the BB16 application immediately after the imazapyr conferred tolerance of plants to the toxic effects of herbicide; however, this herbicide did not provide the expected protection when applied 12 hours before BB16. Besides, it was verified that the herbicides caused deleterious effect in the photosynthetic apparatus of the eucalypt seedlings; moreover, the glyphosate presence resulted in lower time to express these effects.

1. INTRODUÇÃO

O setor florestal desempenha importante papel na economia brasileira, tanto em termos de geração de divisas como de empregos diretos ou indiretos (Juvenal e Mattos, 2002), devido à alta competitividade do setor no mercado externo (Carvalho et al., 2005), a investimentos no aumento da produtividade, ao marketing florestal (Lélis, 1999) e à busca de programas sustentáveis (Nardelli et al., 2000), sob uma visão mais holística do empreendedor.

Entre os fatores responsáveis pelo aumento da produtividade, está o uso de herbicidas no controle de brotações quando se opta pela reforma dos povoamentos com eucalipto, o que proporciona maior eficiência de controle das mesmas e menor compactação ao solo. Desta forma, evita-se o emprego de tratores de pneus sobre a área para execução desta operação. Têm sido utilizados herbicidas sistêmicos e não-seletivos, como o glyphosate e o imazapyr, sendo este último de maior utilização por permitir que se faça o corte das árvores entre 30 a 120 dias após a aplicação do herbicida, favorecendo a melhor alocação de mão-de-obra dentro deste período. Além disso, a utilização de imazapyr implica no uso de baixas concentrações por hectare e apresenta maior eficiência de controle das brotações em relação à utilização de glyphosate. Contudo, tem-se percebido deficiência de controle em certas áreas e, em outras, observa-se intoxicação em mudas novas quando da reforma dos povoamentos.

Apesar de sua alta eficiência operacional, há preocupação quanto às doses utilizadas e ao destino final da molécula, pois o imazapyr poderia não ficar restrito ao eucalipto, sendo metabolizado a compostos tóxicos, com posterior exsudação no solo pelas raízes da planta. Portanto, há necessidade de analisar-se o grau de toxidez do exsudado, pois este pode causar interferência deletéria em plantas vizinhas.

Para a utilização de imazapyr no controle de brotações, sem causar intoxicação às mudas de eucalipto plantadas nas entrelinhas, necessita-se de adequação de doses em relação aos diferentes genótipos utilizados e às condições edáficas, assim como, estudos mais apurados com relação ao comportamento de possíveis exsudados radiculares no solo e, a interatividade destes com as mudas plantadas posteriormente na área tratada. Uma das opções paliativas seria a adoção de antídotos, os quais visam aumentar a seletividade do herbicida à cultura (Jablonkai e Dutka, 1995) sem reduzir a atividade nas espécies-alvo. Os antídotos têm distintos potenciais de uso, que incluem a proteção das culturas contra os danos causados por resíduos de herbicidas e o uso dos mesmos sob condições adversas, onde o dano ao cultivo, provavelmente, seria deletério (Davies e Caseley, 1999).

É sabido que os brassinosteróides, de uma forma geral, participam efetivamente de processos de tolerância das plantas a diversos tipos de estresse como, por exemplo, a temperaturas extremas, seca, salinidade e ataque de patógenos (Krishna, 2003), principalmente em virtude da indução de enzimas antioxidantes (Khripach et al., 2000; Özdemir et al., 2004). Sendo assim, é possível também, que estes hormônios possam conferir tolerância aos estresses químicos, como os advindos da aplicação de herbicidas, funcionando como antídoto à presença destes.

Foram realizados três experimentos em casa de vegetação com o intuito de avaliar os efeitos da exsudação radicular de imazapyr por *Eucalyptus grandis* no crescimento de mudas deste gênero, assim como, identificar alterações celulares em decorrência dos exsudados presentes em solução; além de, verificar a possível interação entre os herbicidas utilizados no controle de brotações em eucaliptais com um análogo de brassinosteróide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carvalho, R.M.M.A., Soares, T.S., Valverde, S.R. (2005) Caracterização do setor florestal: uma abordagem comparativa com outros setores da economia. *Ciê. Florestal*, 15 (1):105-118
- Davies, J., Caseley, J.C. (1999) Herbicides safeners: a review. *Pest. Sci.* 55 (11):1043-1058.
- Jablonkai, I., Dutka, F. (1995) Uptake, translocation and metabolism of MG-191 safener in corn (*Zea mays* L.). *Weed Sci.* 43 (1):169-174.
- Juvenal, T.L., Mattos, R.L.G. (2002) O setor florestal no Brasil e a importância do reflorestamento. *BNDES Setorial*, 16:3-30.
- Khripach, V., Zhabinskii, V., De Groot, A.D. (2000) Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann. Bot.* 86 (3):441-447.
- Krishna, P. (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.* 22 (4):289-297.
- Lélis, V.G.S. (1999) Certificação florestal. *Folha Florestal*, 92:23-24.
- Nardelli, A.M.B., Nascimento, A.R., Griffith, J.J., Silva, M.L. (2000) Certificação florestal: uma realidade também no Brasil. *Folha Florestal*, 96:7-9.
- Özdemir, F., Bor, M., Demiral, T., Türkan, İ. (2004) Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regul.* 42 (3): 203-211.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Glyphosate e imazapyr no controle de brotações em eucaliptais

O Brasil vem se tornando grande exportador de produtos florestais, o que se deve à sua grande competitividade neste setor em decorrência de melhoramento genético dos materiais cultivados (Ferreira e Santos, 1997), mecanização da colheita e transporte (Souza et al., 1999), avanço das pesquisas no setor (Stape, 1999), busca de certificação florestal (Suiter Filho, 2001), aperfeiçoamento de práticas silviculturais, dentre elas, o controle de brotações, quando da reforma dos talhões.

Um dos problemas mais comuns encontrado pelas empresas do setor florestal é decidir qual será a alternativa mais viável para a futura condução do talhão, optando-se ou não pela reforma do cultivo atual. Isso significa ter que optar entre a substituição da floresta atual por uma nova e, o corte de mais uma rotação. Com relação à brotação, o problema envolve a escolha entre a condução proveniente do corte da floresta atual (talhadia) e a substituição desta por uma nova (reforma) (Klein et al., 1997).

Apesar de ser o eucalipto um gênero que possui espécies de rápido crescimento e de certa plasticidade quanto a seu estabelecimento no campo, ele não está isento da competição por água, luz e nutrientes, gerada pelas brotações. O controle tardio das brotações após o corte raso da floresta implicará em maior

período de competição destas com as mudas nas entrelinhas do cultivo anterior, reduzindo ganhos de produtividade.

O controle da rebrota em eucaliptais pode ser realizado por meio de rebaixadores mecânicos de tocos (Respondovesk, 1999) ou com a utilização de herbicidas (Moorhead, 2006). Alguns trabalhos têm sido realizados com o intuito de controlar as brotações, provenientes do corte raso da floresta, utilizando-se somente herbicidas não-seletivos para o eucalipto. Christoffoleti et al. (1997) utilizaram aplicações de imazapyr (0,125; 0,250 e 1,000% p/v na calda de aplicação) e glyphosate (1,440% p/v) 24, 48 e 72 horas após o corte (HAC) do eucalipto e verificaram a viabilidade de controle da rebrota com uso de imazapyr até 72 HAC, desde que na concentração mínima de 0,500% p/v.

Respondovesk (1999) constatou controle de brotações acima de 90% quando se utilizou 0,6 mL/árvore do produto comercial na concentração de 0,250 g L⁻¹ de imazapyr, aplicado em uma inserção no fuste e utilizando pistola dosadora (sistema Gorajet – desenvolvido pela empresa fabricante do herbicida). O mesmo não foi verificado mediante a utilização de rebaixador mecânico de tocos, ou quando o glyphosate foi aplicado a 6% até 12 HAC, ou quando encapsulado (na forma de grânulos) e aplicado em uma inserção na árvore ou, ainda, quando o herbicida foi aplicado no caule por meio de machadinha química.

No entanto, têm sido verificados diferentes níveis de eficiência do imazapyr quando injetado no caule, nas doses de 0,2 a 0,5 mL/árvore, para controle da brotação no pré-corte de árvores de eucalipto. Segundo Whitford et al. (1995), a eficiência no controle da brotação depende da espécie, do herbicida utilizado, da dose e época de aplicação. Dantas et al. (2001) verificaram diferenças no controle de brotações de clones de eucalipto após inserção na árvore e injeção de glyphosate, com eficiência próxima a 55%, aos 90 dias após o corte.

Basicamente, no controle de brotações por meio de herbicidas, o glyphosate é utilizado no pós-corte com a brotação já estabelecida (\pm 1,5 m de altura) ou o imazapyr, no pré-corte das árvores, por injeção em uma inserção de cerca de 2,5 cm na árvore, à altura do peito - 1,30 m (Moorhead, 2006). A dose deve ser determinada de acordo com a espécie, o híbrido ou clone utilizados em função de haver diferença de tolerância ao imazapyr em mudas de eucalipto (Silva et al., 2004).

2.2. Exsudação radicular

Vários grupamentos orgânicos podem ser liberados por meio de exsudados radiculares em espécies herbáceas e lenhosas, em solo ou em solução, como ácidos orgânicos, carboidratos, aminoácidos, isoflavonóides e enzimas (McDougall, 1970; Dakora et al., 1993; Silva et al., 2001; Dakora e Phillips, 2002; Kremer et al., 2005). Os mecanismos responsáveis pela exsudação radicular são pouco estudados, porém a significância biológica da exsudação deve ser considerada, haja vista que a exsudação de certos compostos pode ser fator inibitório para o desenvolvimento de plantas vizinhas (Kato-Noguchi et al., 2002). Exsudados radiculares de aveia selvagem (*Avena fatua*) inibiram o crescimento de raízes e coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*), sendo os mesmos constituídos de escopoletina, coumarina, ácido *p*-hidroxibenzóico e ácido vanílico (Pérez e Nuñez, 1991).

Além disso, tem-se constatado que alguns herbicidas também são capazes de serem exsudados pelo sistema radicular de plantas daninhas e de culturas agrícolas. Tuffi Santos et al. (2005) verificaram que a exsudação radicular de glyphosate por braquiária (*Brachiaria decumbens*) interferiu na atividade microbiana do solo, principalmente com o aumento das doses aplicadas para controle desta espécie. Em condições de solos arenosos (acima de 52% de areia) o exsudado radicular contendo glyphosate pode causar, por exemplo, redução no crescimento de plântulas de milho (Rodrigues et al., 1982).

A acumulação em estruturas da planta, com posterior exsudação, é uma das formas de detoxificação do herbicida utilizada por algumas plantas, como constatado por Fites et al. (1964) em plantas de quinquilho (*Datura stramonium*) após seis semanas da aplicação foliar de 2,4-D. O nicosulfuron, por exemplo, quando aplicado sobre o capim-massambará (*Sorghum halepense*), pode ser exsudado, na sua forma original e, ou, em metabólitos tóxicos, pelo sistema radicular da planta daninha e ser absorvido pela cultura do milho; ou então, pode modificar a composição aleloquímica do *S. halepense*, acentuando a intoxicação sobre a cultura (Gubbiga et al., 1996).

A exsudação radicular de substâncias orgânicas pode ser influenciada por vários fatores, como estresse hídrico, temperatura, intensidade luminosa, idade e espécies de planta, nutrição mineral, microrganismos no solo, grau de anaerobiose e aplicação de biocidas (Hale et al., 1971). Esses fatores, somados

às características físico-químicas dos herbicidas utilizados, irão determinar o potencial exsudativo, bem como o grau de interferência de exsudados radiculares sobre plantas vizinhas às que receberam aplicação do herbicida.

O ápice da raiz, ou a região imediatamente abaixo deste, pode ser considerado o local mais importante de exsudação, sendo que outras partes desta também podem exsudar compostos orgânicos (Walker et al., 2003). No entanto, a toxidez causada pela exsudação do herbicida e, ou, de seus metabólitos, dependerá de fatores bióticos e abióticos e não somente da presença da molécula no solo.

2.3. Brassinosteróides

Os brassinosteróides (BR), como os demais hormônios, são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo que mais de 40 destes têm sido isolados de várias espécies vegetais (Yokota, 1997). A aplicação de brassinosteróides causa respostas significativas no crescimento das plantas, incluindo expansão foliar (Oriika Ono et al., 2000), inibição de raízes (Roddick et al., 1993), ativação de bombas de prótons (Müssig e Altmann, 1999), diferenciação dos elementos de tubos crivados (Yamamoto et al., 2001), diferenciação e divisão de células (Sasse, 1997), com conseqüente alongamento celular (Szekeres et al., 1996; Azpiroz et al., 1998).

Em geral, estes hormônios participam, efetivamente, dos processos de tolerância a diversos tipos de estresse. Segundo Krishna (2003), BR afetam a expressão de sintomas de doença em plantas de tomate inoculadas com *Verticillium dahliae*. As raízes inoculadas com este patógeno e crescidas por 14 dias em presença de epi-brassinolídeo (EBR) não demonstraram sintomas, ou estes foram de pequena intensidade; todavia, as plantas não tratadas com EBR apresentaram moderado ou severo sintoma característico do processo de infecção deste fungo. A exposição das plântulas por curto espaço de tempo a EBR, antes da inoculação de *V. dahliae*, não reduziu os sintomas da doença, o que demonstra, que EBR só foi efetivo quando o patógeno já estava presente nos tecidos da planta.

Anuradha e Rao (2003) verificaram que a aplicação de brassinosteróides às sementes de arroz (*Oryza sativa*) resultou em decréscimo da atividade inibitória

do estresse salino no crescimento das plantas, provavelmente devido ao aumento nos níveis de ácidos nucléicos e proteínas solúveis (Anuradha e Rao, 2001).

Pustovoitova et al. (2001) verificaram resistência à seca em plantas de pepino (*Cucumis sativus*) tratadas com brassinosteróide, onde o aumento no conteúdo de aminoácidos livres e amidas nas folhas foram verificados nas plantas tratadas. Utilizando esta mesma planta, Khripach et al. (2000) verificaram aumento na atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, dado por brassinosteróides, sendo estes envolvidos no metabolismo de polifenóis, os quais são contribuintes da resistência de pepino a doenças. Plantas de tabaco (submetidas ao vírus do mosaico, a *Pseudomonas syringae* e *Oidium* sp.) e arroz (sob exposição a *Magnaporthe grisea* e *Xanthomonas oryzae*) foram resistentes a estes patógenos em virtude da aplicação prévia de brassinolídeo (Nakashita et al., 2003).

Com relação à proteção contra altas temperaturas a aplicação de 24-epibrassinolídeo promove aumento na termoregulação de plântulas de canola (*Brassica napus*), por aumentar a síntese de proteínas de proteção contra estresse por temperaturas elevadas (Dhaubhadel et al., 2002). Já plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), sob 40 °C por 1,5 horas, apresentam grânulos nos núcleos, nucléolos e citoplasma, além de desorganização do sistema de membranas internas nos cloroplastos e mitocôndrias, sendo que estes sintomas são mais pronunciados em plantas tratadas previamente com brassinosteróides (Sam et al., 2001), provavelmente devido ao fato que estes hormônios ativam a síntese de polipeptídeos com massa molecular similar às proteínas induzidas por estresse térmico (Dhaubhadel et al., 2002).

Alguns trabalhos têm sido realizados demonstrando a inter-relação existente de brassinosteróides e outros hormônios, como ácido abscísico (Ábrahám et al., 2003), etileno (Müssig et al., 2003) e jasmonato (Schaller et al., 2000). No entanto, são escassos os estudos relacionados à aplicação de compostos exógenos à planta e a relação destes com o balanço hormonal. Sekimata et al. (2002) verificaram inibição da biossíntese de brassinosteróides após a aplicação do fungicida propiconazole, sendo que este promove ainda o retardamento do processo de alongamento do caule. Contudo, ainda é incipiente os trabalhos referentes à interação hormonal com produtos utilizados em plantios comerciais, principalmente com relação a herbicidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ábrahám, E., Rigo, G., Szekely, G., Nagy, R., Koncz, C., Szabados, L. (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 51 (3):363-372.
- Anuradha, S., Rao, S.S.R. (2001) Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regul.* 33 (2):151-153.
- Anuradha, S., Rao, S.S.R. (2003) Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. *Plant Growth Regul.* 40 (1):29-32.
- Azpiroz, R., Wu, Y., Locascio, J.C., Feldmann, K.A. (1998) An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell.* 10 (2):219-230.
- Christoffoleti, P.J., Shincariol, V., Coelho, J.V.G. (1997) Controle da rebrota de tocos de eucalipto através do herbicida imazapyr. *Resumos do Congresso Brasileiro de Ciência das Plantas Daninhas*, 21, Caxambu: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, v.1, p. 287.
- Dakora, F.D., Joseph, C.M., Phillips, D.A. (1993) Alfafa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 101 (3):819-824.
- Dakora, F.D., Phillips, D.A. (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil*, 245 (1):35-47.
- Dantas, F.W.F., Souza, A.J., Di Cierro, A. (2001) Controle da rebrota de eucalipto em área de reflorestamento. *Anais do Seminário Nacional sobre Herbicidas e Tecnologia de Aplicação em Florestas*, 1, 1999, Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais. p. 29-44.
- Dhaubhadel, S., Browning, K.S., Gallie, D.R., Krishna, P. (2002) Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant J.* 29 (6):681-691.
- Ferreira, M., Santos, P.E.T. (1997) Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. *Proceedings of the*

- IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypt*, 4, Salvador: Colombo - EMBRAPA/CNPQ, 1:14-34.
- Fites, R.C., Slife, F.W., Hanson, J.B. (1964) Translocation and metabolism of radioactive 2,4-D in jimsonweed. *Weeds*, 12 (3):180-183.
- Gubbiga, N.G., Worsham, A.D., Corbin, F.T. (1996) Root/rhizome exudation of nicosulfuron from treated johnsongrass (*Sorghum halepense*) and possible implications for corn (*Zea mays*). *Weed Sci.* 44 (3):455-460.
- Hale, M.G., Foy, C.L., Shay, F.J. (1971) Factors affecting root exudation. *Adv. Agron.* 23 (1):89-109.
- Kato-Noguchi, H., Ino, T., Sata, N., Yamamura, S. (2002) Isolation and identification of a potent allelopathic substance in rice root exudates. *Physiol. Plant.* 115 (3):401-405.
- Khripach, V., Zhabinskii, V., De Groot, A.D. (2000) Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann. Bot.* 86 (3):441-447.
- Klein, J.E.M., Bortolas, E.P., Assis, T.F., Perrando, E.R. (1997) Fatores operacionais que afetam a regeneração do *Eucalyptus*: manejo por talhadia. *Série Técnica IPEF*, 30:95-104.
- Kremer, R.J., Means, N.E., Kim, S. (2005) Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 85 (15):1165-1174.
- Krishna, P. (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.* 22 (4):289-297.
- McDougall, B.M. (1970) Movement of ^{14}C -photosynthate into the roots of wheat seedlings and exudation of ^{14}C from intact roots. *New Phytol.* 69 (1):37-46.
- Moorhead, D.J. - Forest Herbicides;
http://www.ent.uga.edu/pmh/Trees/forest_herbicides.htm em 30/01/2006.
 Página mantida por Georgia Pest Management Handbook.
- Müssig, C., Altmann, T. (1999) Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids. *Plant Physiol. Biochem.* 37 (5):363-372.
- Müssig, C., Shin, G.-H., Altmann, T. (2003) Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133 (3):1261-1271.

- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., Yoshida, S. (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.* 33 (5):887-898.
- Orika Ono, E., Nakamura, T., Machado, S.R., Rodrigues, J.D. (2000) Application of brassinosteroid to *Tabebuia alba* (Bignoniaceae) plants. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 12 (3):187-194.
- Pérez, F.J., Nuñez, J.O. (1991) Root exudates of wild oats: allelopathic effect on spring wheat. *Phytochemistry*, 30 (7):2199-2202.
- Pustovoitova, T.N., Zhdanova, N.E., Zholkevich, V.N. (2001) Epibrassinolide increases plant drought resistance. *Dokl. Biochem. Biophys.* 376 (1):36-38.
- Respondevesk, R.J. (1999) Controle de brotações em reformas de plantações florestais na RIPASA, CD-ROM do *I Seminário sobre Controle de Plantas Infestantes em Áreas Florestais*, Piracicaba, SP, Brasil.
- Roddick, J., Rijnenberg, A.L., Ikekawa, N. (1993) Developmental effects of 24-epibrassinolide in excised roots of tomato growth in vitro. *Physiol. Plant.* 87 (4):453-458.
- Rodrigues, J.J.V., Worsham, A.D., Corbin, F.T. (1982) Exudation of glyphosate from wheat (*Triticum aestivum*) plants and its effects on interplanted corn (*Zea mays*) and soybeans (*Glycine max*). *Weed Sci.* 30 (2):316-320.
- Sam, O., Núñez, M., Ruiz-Sánchez, M.C., Dell'Amico, J., Falcón, V., De La Rosa, M.C., Seoane, J. (2001) Effect of a brassinosteroid analogue and high temperature stress on leaf ultrastructure of *Lycopersicon esculentum*. *Biol. Plant.* 44 (2):213-218.
- Sasse, J.M. (1997) Recent progress in brassinosteroid research. *Physiol. Plant.* 100 (3):696-701.
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T., Weiler, E.W. (2000) 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*, 210 (6):979-984.
- Sekimata, K., Han, S.-Y., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Yoshida, S., Asami, T. (2002) A specific and potent inhibitor of brassinosteroid biosynthesis possessing a dioxolane ring. *J. Agric. Food Chem.* 50 (12):3486-3490.
- Silva, F.A.M., Nogueira, F.D., Ribeiro, L.L., Godinho, A., Guimarães, P.T.G. (2001) Exsudação de ácidos orgânicos em rizosfera de plantas daninhas. *Planta Daninha*, 19 (2):193-196.

- Silva, C.M.M., Ferreira, L.R., Ferreira, F.A., Miranda, G.V. (2004) Tolerance of eucalypt (*Eucalyptus* spp.) seedlings to imazapyr in nutritive solution. *Planta Daninha*, 22 (4):597-606.
- Souza, A.P., Machado, C.C., Minetti, L.J., Jacovine, L.A.G. (1999) Pesquisa na área de colheita e transporte florestal. *Anais do Simpósio Brasileiro de Pesquisa Florestal*, 3, Viçosa:SIF, p. 43-89.
- Stape, J.L. (1999) O papel da pesquisa florestal na sustentabilidade e estabilidade de sistemas silviculturais “momentaneamente” otimizados. *Anais do Simpósio Brasileiro de Pesquisa Florestal*, 3, Viçosa: SIF, p. 1-18.
- Suiter Filho, W. (2001) Comprovadamente correto: o avanço da certificação florestal conforme o FSC incentiva o manejo responsável na extração florestal. *Agroanalysis*, 21 (1):17-20.
- Szekeress, M., Nemeth, K., Koncz-Kalman, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Redei, G.P., Nagy, F., Schell, J., Koncz, C. (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and deetiolation in *Arabidopsis*. *Cell*, 85 (2):171-182.
- Tuffi Santos, L.D., Ferreira, F.A., Barros, N.F., Siqueira, C.H., Santos, I.C., Machado, A.F.L. (2005) Exsudação radicular do glyphosate por *Brachiaria decumbens* e seus efeitos em plantas de eucalipto e na respiração microbiana do solo. *Planta Daninha*, 23 (1):143-152.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M. (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132 (1):44-51.
- Whitford, K.R., Stoneman, G.L., Freman, I.A. et al. (1995) Mortality of *Eucalyptus marginata* (jarrah) and *E. calophylla* (Marri) trees following stem injection: effects of herbicide, dose, season, and spacing of injections. *Aust. For.* 58 (4):172-178.
- Yamamoto, R., Fujioka, S., Demura, T., Takatsuto, S., Yoshida, S., Fukuda, H. (2001) Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements. *Plant Physiol.* 125 (2):556-563.
- Yokota, T. (1997) The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* 2 (4):137-143.

3. TRABALHOS

3.1. DANOS ULTRAESTRUTURAIS EM MUDAS DE *Eucalyptus grandis* DECORRENTES DA APLICAÇÃO DE IMAZAPYR

RESUMO

O imazapyr é um herbicida utilizado no controle de brotações na reforma de povoamentos com o gênero *Eucalyptus*, sendo aplicado exclusivamente à planta, porém, pouco é encontrado na literatura, a respeito do destino final da molécula. A exsudação radicular de mudas de eucalipto, submetidas à aplicação deste herbicida, foi avaliada através de bioensaio em casa de vegetação, em sistema hidropônico, utilizando vasos contendo 2.500 mL de solução nutritiva e mudas clonais de *E. grandis*, as quais receberam a aplicação de 1,500 kg ha⁻¹ de imazapyr. Quinze dias após a aplicação do herbicida, as mudas-controle e as que receberam imazapyr foram retiradas da solução e em, seus respectivos lugares, foi transplantada uma muda do mesmo clone por vaso, constituindo-se o bioindicador (BIO) dos efeitos da exsudação radicular. Os efeitos dos exsudados sobre o crescimento das mudas foram avaliados aos 60 dias após o transplante dos BIOS, mensurando-se a altura e o diâmetro, e determinando-se a biomassa seca da parte aérea e de raízes. Além disso, amostras das gemas apicais dos

ramos foram coletadas para análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão às 72 horas após o transplante dos BIODs. Os exsudados radiculares das mudas submetidas à aplicação de imazapyr causaram alterações significativas em todas as variáveis estudadas, sendo que os BIODs apresentaram mudanças ultraestruturais nas células, tais como: aumento do número de células mesofílicas deformadas, cloroplastos com pequena quantidade de tilacóides, distorção das cristas da matriz mitocondrial, vacuolização do citoplasma e rompimento de parede celular devido a alterações no sistema de endomembranas. Os compostos presentes em solução promoveram inibição total do crescimento, assim como mudanças ultraestruturais e anatômicas nas mudas de eucalipto utilizadas como BIODs.

ULTRASTRUCTURAL DAMAGES IN SEEDLINGS OF *Eucalyptus grandis* RESULTING FROM IMAZAPYR APPLICATION

ABSTRACT

Imazapyr is an herbicide used to control stump sprouting in stand of *Eucalyptus* crop, applied exclusively in the plant, but little is known about the final destination of the molecule. Imazapyr root exudation in eucalypt seedlings subdued to application of this herbicide was evaluated through a bioassay under greenhouse conditions, in hydroponic system, using vases with 2,500 mL of nutritive solution and *E. grandis* seedlings, which received the application of 1.500 kg ha⁻¹ of imazapyr. In a period of 15 days after treatment application, the seedlings-control and those that received the herbicide application were removed from the solution and, in their respective places was transplanted one seedling/vase of the same clone, which constituted the bioindicator of the effects of the root exudation. The exudates effects over the seedling growth were carried out 60 days after the bioindicator transplanting, with the measurement of height and diameter, and the determination of the dry biomass of aerial part and root system of the seedlings. Besides, samples of the terminal bud of branches were collected to ultrastructural analysis by transmission electron microscopy at 72 hours after the bioindicators transplanting. The root exudates of eucalypt seedlings

submitted to herbicide application caused significant alterations in all variables analyzed, and the bioindicators showed ultrastructural changes in the cells, such as: increase of the number of irregular shaped mesophyll cells, chloroplast with small quantity of thylakoid, distortion of cristae of the mitochondrial matrix, vacuolization of the cytoplasm, and rupture of cell wall due to disorder of the endomembrane systems. The compounds present in solution affected the growth of eucalypt seedlings, as well as ultrastructural and anatomic changes in the eucalypt seedlings used as bioindicators.

INTRODUÇÃO

Em plantios comerciais com o gênero *Eucalyptus* são requeridos herbicidas que sejam eficientes no controle das brotações (quando da reforma dos talhões) mas que, ao mesmo tempo, apresentem ausência ou baixo período residual no solo, com o intuito de não comprometerem o crescimento e, ou, desenvolvimento de mudas no plantio posterior ao corte raso. Basicamente, no controle de brotações, são utilizados os herbicidas glyphosate (com aplicação no pós-corte das árvores sendo a brotação já estabelecida ($\pm 1,5$ m de altura) ou até 72 horas após o corte, sendo a aplicação feita sobre a cepa (Christoffoleti et al., 1997)) ou então, a utilização de imazapyr (com aplicação no pré-corte das árvores). Este último, no entanto, tem sido mais utilizado devido a sua alta eficiência de controle e maior flexibilidade de tempo entre a aplicação e o corte das árvores, em relação à aplicação de glyphosate (Dantas et al., 2001).

Todavia, em alguns casos, têm sido verificados problemas de intoxicação às mudas presentes nas entrelinhas do cultivo anterior, quando da aplicação prévia de imazapyr na dose média de 0,5 mL/árvore do produto comercial, por meio de injeção mecânica no caule em uma inserção de cerca de 2,5 cm na árvore, à altura do peito - 1,30 m (Moorhead, 2006). Segundo Silva et al. (2004 e 2005), a aplicação de imazapyr em mudas de eucalipto pode induzir à exsudação de compostos capazes de causar intoxicação às mudas do mesmo gênero cultivadas próximas a este, o que endossa o surgimento de sintomas de intoxicação nas mudas plantadas nas entrelinhas.

Entretanto, há escassez de informações quanto aos efeitos nas células decorrentes da presença dos compostos na solução, os quais podem provocar redução do crescimento das mudas e o surgimento dos sintomas visuais de intoxicação às mesmas. Para tanto, técnicas microscópicas podem ser utilizadas com o objetivo de elucidar a interferência de alguns herbicidas no crescimento e desenvolvimento das células.

Alterações de alguns parâmetros morfofisiológicos, por exemplo, podem ser utilizados como bioindicadores do uso indiscriminado de herbicidas em plantios situados em fronteiras agrícolas, destacando-se a germinação e crescimento do tubo polínico. Ovidi et al. (2001) observaram que os herbicidas glyphosate (inibidor da enzima 3-enoilpiruvilxiquimato-5-fosfato sintase) e diclofop-metil (inibidor da enzima acetil-CoA carboxilase), apesar de não atuarem diretamente no processo de divisão celular, promoveram intensa despolimerização dos microtúbulos de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), o mesmo foi verificado quando da utilização de trifluralin (inibidor da mitose); contudo a aplicação de oxadiazon (inibidor da enzima protoporfirinogênio IX oxidase – PROTOX) não afetou significativamente este processo. Já a aplicação do herbicida 2-cloro-6-fluorofenil-4-(trifluorometil)tieno[2,3-d]pirimidina-2-il-cetona induziu alterações no processo mitótico em células radiculares de aveia (*Avena sativa* cv. Zenshin), originando grande número de células polinucleadas no meristema radicular, devido à inibição da polimerização da tubulina constituinte dos microtúbulos (Takahashi et al., 2001).

Estudos anatômicos, realizados a partir de microscopia eletrônica de transmissão, revelaram a presença de grandes vacúolos, numerosos grãos de amido e poucos ribossomos no retículo endoplasmático do pólen de plantas de algodão-GR (resistente ao glyphosate) tratadas com este herbicida, o que levou a grãos de pólen imaturos na antese (Pline et al., 2002). Ferreira et al. (1999) verificaram que os herbicidas, utilizados em pós-emergência de trapoeraba (*Commelina benghalensis*), causaram mudanças ultraestruturais nas células foliares, uma vez que os tilacóides nas células parenquimáticas se dilataram, conferindo formato esférico aos cloroplastos, interferindo no processo fotossintético. Plantas de soja tratadas com diuron revelaram desorganização na ultraestrutura de organelas das células do mesófilo como, ausência de grãos de amido em células-guarda, redução de plastoglobulina e mudanças no arranjo da

grana nos tilacóides, com aumento do espaço intratilacoidal e formação de várias vesículas (Fayez, 2000).

Com a utilização de microscopia de fluorescência, Warabi et al. (2002) verificaram que células de soja resistente ao oxyfluorfen acumularam menor quantidade de protoporfirina IX devido à menor inibição da PROTOX.

Em virtude do exposto, este ensaio teve como objetivos caracterizar as alterações ultraestruturais das células das gemas apicais dos ramos de mudas de *E. grandis*, submetidas à ação de compostos exsudados por mudas desta espécie previamente tratadas com imazapyr, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão; além de verificar interferências no crescimento das mudas em decorrências da presença de exsudados na solução.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi realizado em casa de vegetação no Campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em sistema hidropônico, utilizando-se vasos plásticos com 2.500 mL de solução nutritiva, a qual teve o pH corrigido a cada dois dias para $5,50 \pm 0,10$, utilizando hidróxido de sódio ou ácido clorídrico para a correção. Os vasos receberam revestimento prateado nas paredes externas e foram envoltos internamente por camada plástica transparente. As tampas dos recipientes apresentavam duas perfurações com diâmetros de 14 mm e uma de 2 mm, sendo as primeiras utilizadas para receber as mudas de eucalipto e a perfuração menor destinada à passagem da mangueira condutora de aeração para a solução, ligada a um compressor com fluxo contínuo de ar.

As mudas de *E. grandis* utilizadas foram provenientes de propagação vegetativa (clone 278E), com três meses de idade e altura entre 29,7-35,5 cm, produzidas em recipientes de polipropileno preto (tubetes) de 55 cm³ de capacidade, em substrato composto de casca de arroz carbonizada e vermiculita na proporção de 1:1 v/v. No transplante foram utilizadas mudas homogêneas em altura, as quais tiveram o sistema radicular cuidadosamente lavado e, de imediato, transferidas para solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), sendo uma muda por vaso, onde permaneceram por 30 dias (fase adaptativa) para emissão de novas folhas e raízes. A solução nutritiva foi trocada a cada 10 dias, sendo a

última troca no dia da aplicação foliar de imazapyr, a qual foi realizada utilizando-se um pulverizador costal pressurizado a CO₂, mantido à pressão constante de 30 lb pol⁻², provido de bico de jato plano (tipo leque) Teejet DG95.02 EVS, calibrado para aplicar o volume equivalente a 200 L ha⁻¹ de calda, tomando-se o cuidado prévio de cobrir a superfície dos vasos com dupla camada plástica, para evitar a contaminação da solução nutritiva.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado sendo os tratamentos compostos de duas doses de imazapyr (zero e 1,500 kg ha⁻¹) com dez repetições, sendo cinco destas utilizadas para retirada das gemas dos ramos. Quinze dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), as mudas-controle e as que receberam a aplicação do herbicida foram retiradas da solução e, em seus respectivos lugares, foi transplantada para cada vaso uma muda do mesmo clone com 100 dias de idade e altura média de 31 cm, a qual constituiu o bioindicador (BIO) da presença da exsudação radicular do herbicida em solução.

As amostras para análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas 72 horas após o transplante dos BIOS, mediante secções de cerca de 3 mm nas gemas apicais dos ramos, sendo as amostras imediatamente embebidas em solução tampão fosfato 50 mM, em pH 6,8, para processamento, de acordo com a técnica de microscopia específica descritas por James et al. (1994), com algumas modificações.

A avaliação dos efeitos dos exsudados no crescimento das mudas foi realizada 60 dias após o transplante dos bioindicadores para a solução, mensurando-se a altura (relativa à distância entre o colo e a inserção da folha mais nova no ápice da muda) e o diâmetro (medido a 2,5 cm do colo da muda) utilizando-se uma régua graduada e um paquímetro digital, respectivamente. Além destas variáveis, determinou-se a biomassa seca da parte aérea e de raízes. Paulatinamente, foram realizadas avaliações visuais de intoxicação documentadas através de fotografias.

Após a obtenção dos resultados procedeu-se à análise descritiva das alterações celulares e à análise de variância dos dados numéricos, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Danos irreversíveis ocorrem quando o sistema de endomembranas é comprometido em decorrência da desorganização da bicamada lipídica da membrana plasmática e, ou, da parede celular. Observações ultraestruturais nas gemas apicais dos ramos dos bioindicadores, cultivados em solução na qual, previamente, havia mudas de eucalipto tratadas com imazapyr (BIOTRAT), revelaram alta desorganização subcelular em comparação aos bioindicadores presentes em solução onde cresceram as mudas-controle (BIOCONTROL). Nestas últimas, foram observadas integridade das membranas e organelas, preservação da parede celular e presença de grande quantidade de grãos de amido (Figura 1), em função do pleno funcionamento do aparato fotossintético, com conseqüente síntese de carboidratos e armazenamento destes nos cloroplastos durante o dia, na forma de amido.

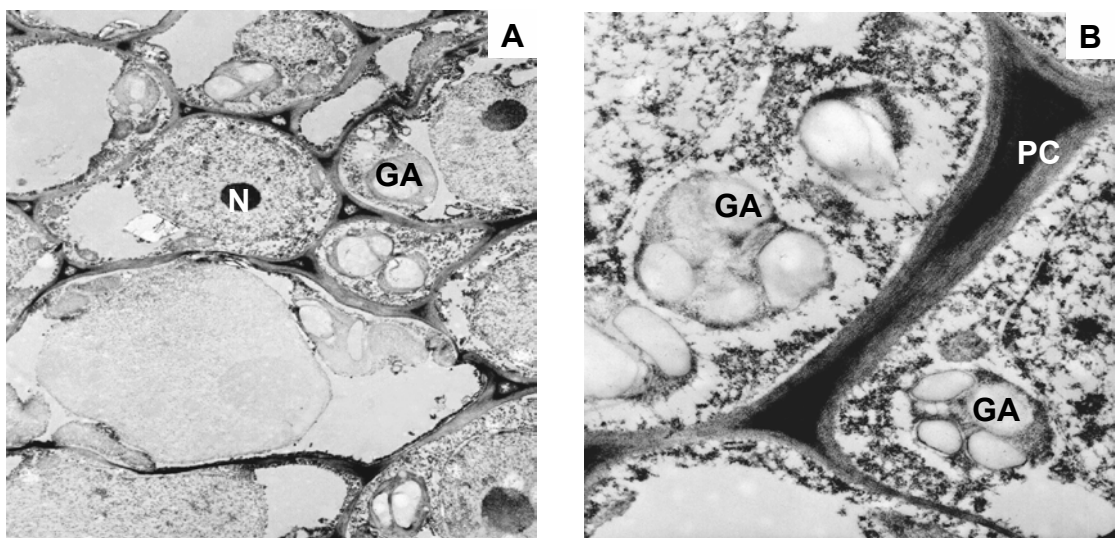


Figura 1 - Micrografias eletrônica de transmissão de gema apical dos ramos de mudas de *Eucalyptus grandis* cultivadas em solução nutritiva na ausência de exsudados radiculares contendo imazapyr, 72 h após o transplante. Aumentos de 3.000 (A) e 7.000x (B). PC = parede celular; GA = grãos de amido; N = núcleo.

Ao analisar as células de gemas apicais de ramos dos BIOTRAT foram verificadas desorganizações dos tilacóides, aumento do volume das membranas destes (o que, conseqüentemente, implica em aumento do espaço intratilacoidal, resultando na formação de várias vesículas), além da presença de poucos grana tilacoidais (Figura 2A). Sintomas semelhantes foram verificados por Saladin et al.

(2003), em folhas de videira (*Vitis vinifera*), sob a ação de flumioxazin, um herbicida inibidor da ação da enzima protoporfirinogênio IX oxidase, o qual bloqueia a síntese de clorofila e induz a formação de oxigênio singleto nas células, em decorrência do acúmulo de protoporfirina IX no citoplasma.

Apesar de terem sido verificadas alterações ultraestruturais nos cloroplastos, em função da presença de exsudados radiculares de mudas previamente tratadas com imazapyr, é sabido que este herbicida não afeta diretamente a fotossíntese e, segundo Shaner e Reider (1986), tem pouco efeito sobre este processo fisiológico. O seu mecanismo de ação, como de outras imidazolinonas, é caracterizado por inibir a ação da enzima acetolactato sintase (ALS), a qual participa da biossíntese dos aminoácidos ramificados leucina, isoleucina e valina (Pang et al., 2003). Desta forma, não há participação direta de cloroplastos no sítio de ação do herbicida.

No entanto, os herbicidas, de uma forma geral, interferem no metabolismo celular, mesmo em reações metabólicas não associadas diretamente com o processo fotossintético (Barbagallo et al., 2003). O presente experimento corrobora esta constatação, tendo em vista o comprometimento da integridade estrutural dos cloroplastos nas células dos BIOTRAT em função da presença de exsudados radiculares de mudas previamente tratadas com o herbicida (Figura 2A).

Muitos herbicidas bloqueiam o transporte de elétrons na fotossíntese por competirem com a plastoquinona B pelo sítio de ligação à proteína D₁ do fotossistema II (Fuerst e Norman, 1991; Egner et al., 1996; Rich, 1996) ou por alterarem o fluxo de elétrons próximo à ferredoxina no fotossistema I (Chase et al., 1998) nas membranas tilacoidais. Em função disto, ocorre destruição do centro de reação destes fotossistemas em virtude da foto-oxidação das moléculas de clorofila e produção de superóxidos (Barry et al., 1990), os quais degradam ácidos graxos da bicamada lipídica constituinte da membrana plasmática, levando à perda de sua seletividade e permeabilidade (Edreva, 2005). Os cloroplastos, contudo, possuem vários mecanismos de detoxificação do oxigênio reativo formado (superóxido) (Niyogi, 1999); no entanto, neste ensaio, os efeitos tóxicos provocados pela presença de exsudados radiculares podem ter inibido, ou anulado, a ação do fotossistema protetor, acarretando em desestruturação do sistema de endomembranas, tanto nos cloroplastos como nas mitocôndrias e parede celular (Figura 2B, C, D, E, F).

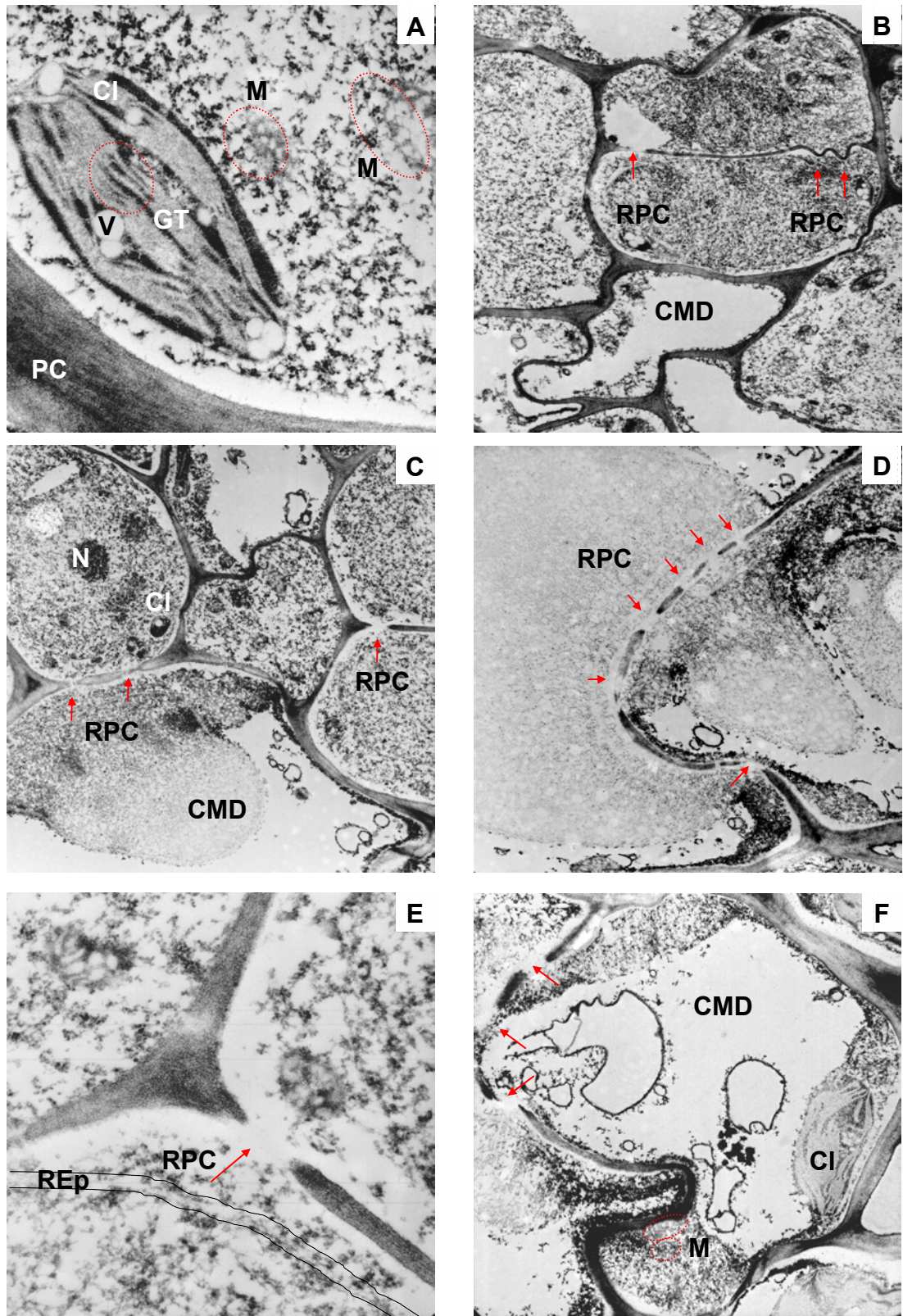


Figura 2 - Micrografias eletrônica de transmissão de gema apical de ramos de bioindicadores dos exsudados radiculares de mudas de *Eucalyptus grandis* previamente tratadas com imazapyr, 72 h após o transplante. Aumentos de 7.000 (B, C, D, F), de 20.000 (A) e de 30.000x (E). Cl = cloroplasto, CMD = células mesofílicas deformadas, GT = grana tilacoidal, N = núcleo, M = mitocôndrias, PC = parede celular, REp = retículo endoplasmático, RPC = pontos de ruptura da parede celular (setas vermelhas), V = vesículas.

Devido às alterações ultraestruturais nestas organelas e, possivelmente, às alterações fisiológicas também, pode-se inferir que há decréscimo da taxa fotossintética e, por conseguinte, redução na produção de ATP (adenosina trifosfato) e carboidratos, acarretando em redução da síntese de fotoassimilados, o que compromete diretamente o crescimento da planta (Figura 3).

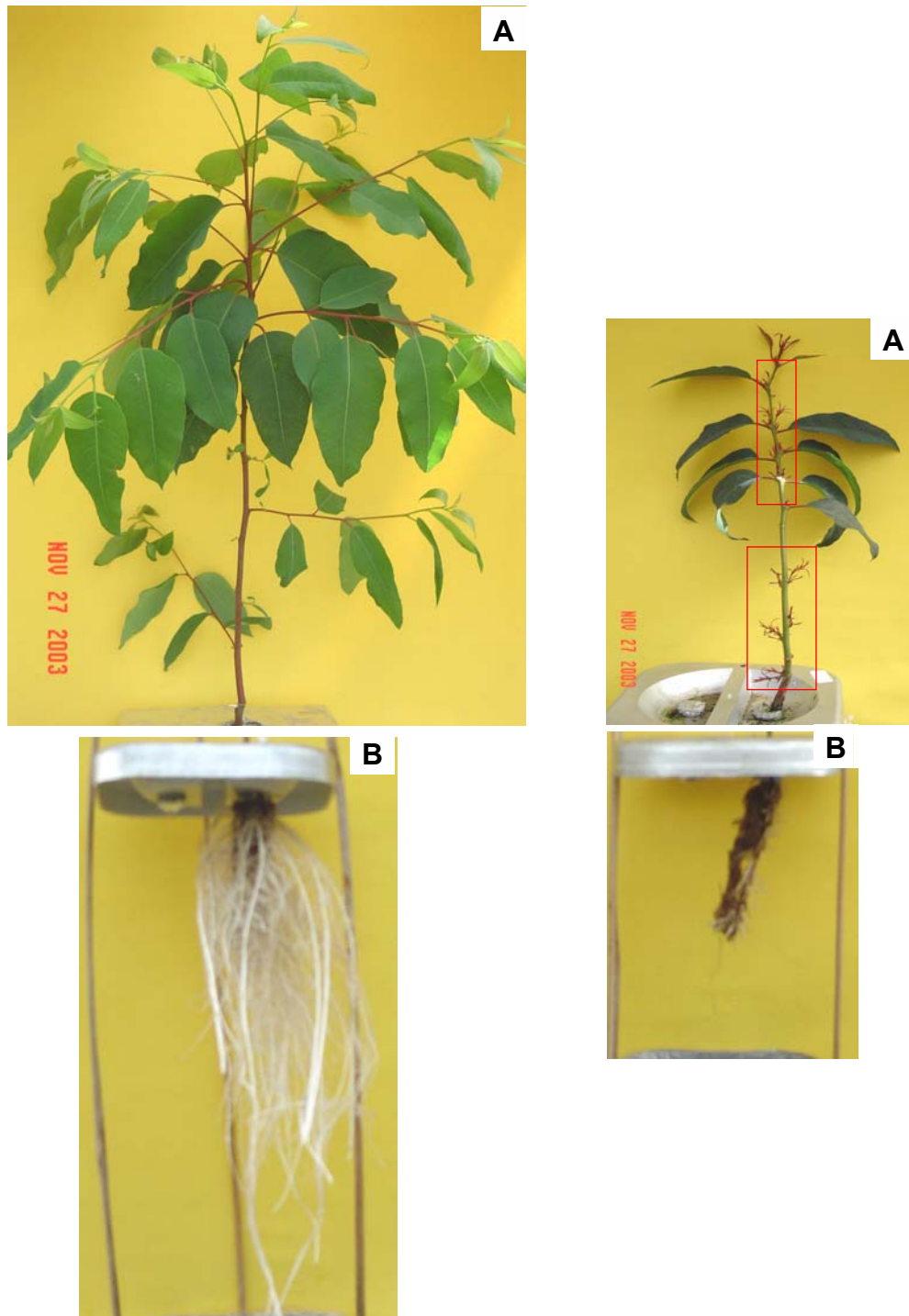


Figura 3 – Aspecto visual dos bioindicadores, 40 dias após o transplante para a solução contendo exsudados radiculares de mudas de *Eucalyptus grandis*. À esquerda, parte aérea (A) e sistema radicular (B) dos BIOCONTROL e, à direita, dos BIOTRAT.

A interferência no balanço hormonal, principalmente com relação ao ácido abscísico, pode ser responsável pela redução na transpiração e no crescimento em plantas tratadas com imidazolinonas (Shaner, 1988). A utilização de herbicidas pertencentes a este grupo químico promove epinastia foliar, proliferação de gemas axilares, redução da dominância apical, clorose e encurtamento dos entrenós (ISU, 2006), o que corrobora com os sintomas visuais verificados nos BIOTRAT (Figura 3A). A inibição da dominância apical, em função da atuação de imazapyr, pode ter levado à proliferação de gemas axilares, sendo que as brotações advindas apresentaram predominância de carotenóides (intensa coloração avermelhada nas folhas) em relação à clorofila; endossado pela expressiva produção de antocianinas verificada por Conner et al. (1994) após a aplicação de chlorsulfuron (um herbicida inibidor da ALS).

Herbicidas que bloqueiam a atividade da enzima ALS podem também promover rápida redução na translocação de fotoassimilados (Bestman et al., 1990) em função da inibição da entrada de sacarose no floema (Hall e Devine, 1993), conseqüentemente, acarretando diminuição no transporte de fotoassimilados. Este transporte pode ser restabelecido após a aplicação dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina, indicando que este sintoma deve-se à inibição da ação da acetolactato sintase (Devine et al., 1990). A interrupção no transporte afeta drasticamente o crescimento radicular, refletindo em menor crescimento da planta em função da menor quantidade de energia (na forma de carboidratos) que chega às raízes e demais órgãos.

Desta forma, a redução na produção de fotoassimilados e do carregamento destes no floema, pode justificar o menor crescimento apresentado pelas mudas do tratamento BIOTRAT, em relação ao tratamento BIOCONTROL, tanto com relação à altura e diâmetro, quanto às biomassas secas de parte aérea e do sistema radicular (Tabela 1). Além disso, segundo Lotan e Fluhr (1990), o acúmulo de α -aminobutirato, em função da ação de imidazolinonas (como o imazapyr), induz o aumento da síntese de etileno e, conseqüentemente, aceleração do processo de senescência e epinastia (Hansen e Grossmann, 2000) e, à inibição do alongamento do caule (Romano et al., 1993).

A quantidade de exsudados radiculares na solução foi capaz de causar redução de 44,3, 50,4, 80,6 e 91,6% na altura, no diâmetro, no acúmulo de biomassa seca do sistema radicular e da parte aérea, respectivamente, quando

comparado aos valores destas variáveis obtidos na ausência destes mesmos exsudados (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios para diâmetro, altura, biomassa seca das raízes (BSR) e da parte aérea (BSPA) de bioindicadores cultivados em solução nutritiva contendo exsudados radiculares de mudas de *Eucalyptus grandis* controle (BIOCONTROL) e, submetidas à aplicação foliar de imazapyr (BIOTRAT), aos 60 dias após o transplante.

Tratamentos	Diâmetro (mm)	Altura (cm)	BSR (g)	BSPA (g)
BIOCONTROL	11,474 a*	60,82 a	8,2246 a	29,2638 a
BIOTRAT	5,686 b	33,88 b	1,597 b	2,4494 b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao inibir a ação da ALS, o imazapyr também induz o acúmulo intracelular de α -aminobutirato ou α -oxobutirato, resultando no aumento da atividade da enzima oxidase alternativa (AOX), sendo esta responsável por catalisar a cadeia respiratória resistente ao cianeto, reduzindo o oxigênio à água (Gaston et al., 2003), o que reflete em inibição da respiração mitocondrial, com conseqüente redução na produção de ATP. Os elétrons advindos dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons (localizada na membrana mitocondrial) e do “pool” de ubiquinona, ao passarem pela rota alternativa e sofrerem a ação da AOX, não passarão pelos complexos III e IV da cadeia, e, conseqüentemente, não serão utilizados na síntese de ATP, interrompendo o fluxo de elétrons na cadeia respiratória (Siedow e Umbach, 1995). Sendo assim, o imazapyr estaria induzindo, como efeito secundário, a redução de energia celular por interferir na síntese de ATP na região das cristas mitocondriais.

As mitocôndrias são muito importantes para o metabolismo que ocorre nos cloroplastos, uma vez que estas possuem diversas enzimas específicas que são utilizadas, sob condição de luz, no balanço da energia celular e no potencial redox da célula (van Lis e Atteia, 2004), o qual é essencial nas rotas metabólicas tanto de cloroplastos (Pfannschmidt, 2003) quanto das próprias mitocôndrias (Szibor et al., 2001). Conseqüentemente, alterações no pleno funcionamento mitocondrial poderão ser refletidas nos cloroplastídios.

A capacidade das mitocôndrias e dos plastídios em detoxificar as células sob ação de radicais livres, superóxidos e, ou, oxigênio reativo formados (em função da atuação de um agente estressante à planta) é limitada. Ou seja, há necessidade de complementação de proteínas e enzimas antioxidantes, as quais são importadas do citoplasma, onde são sintetizadas (Taylor et al., 2003). No entanto, sob a ação de inibidores da síntese de aminoácidos, algumas destas enzimas e, ou, proteínas, podem ter sua síntese prejudicada, o que poderia acarretar em menor atuação do processo de detoxificação celular. Desta forma, toda estrutura organizacional e fisiológica da célula estaria comprometida em função da presença de agentes tóxicos à mesma.

Como o imazapyr inibe a biossíntese de leucina, isoleucina e valina, é de esperar-se que proteínas e enzimas dependentes destes aminoácidos tenham sua síntese prejudicada, o que compromete o “turnover” proteico. Sendo assim, ocorre interferência na síntese de DNA e no crescimento celular, o que acarretará na redução da divisão das células (Shaner e Reider, 1986) e morte das regiões meristemáticas, interrompendo o crescimento (Liebl e Bridges, 2000) e interferindo no uso eficiente da água (Shaner, 1988).

Diante do exposto, apesar da maior persistência da molécula de imazapyr no solo (Liebl e Bridges, 2000), das ligações de fraca intensidade com constituintes deste (Pusino et al., 1997), e da movimentação da molécula por capilaridade (Firmino, 2001), deve-se considerar que, caso haja aplicação de imazapyr no caule das árvores para controle da rebrota em cultivos comerciais de eucalipto, existe a possibilidade de exsudação do herbicida, podendo provocar interferência deletéria sobre o crescimento de mudas utilizadas nas entrelinhas do cultivo posterior (reforma).

CONCLUSÕES

Mudas de *E. grandis* apresentaram exsudação radicular de imazapyr quando este foi aplicado na parte aérea. A quantidade de compostos tóxicos exsudados afetou as variáveis altura e diâmetro das mudas do mesmo clone utilizadas como bioindicadores. Além disso, a toxidez dos exsudados radiculares provocou maior redução no acúmulo de biomassa seca da parte aérea e do

sistema radicular, induzindo também, a um processo de citólise avançado, caracterizado por alterações ultraestruturais das células dos bioindicadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbagallo, R.P., Oxborough, K., Pallet, K.E., Baker, N.R. (2003) Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* 132 (2):485-496.
- Barry, P., Young, A.J., Britton, G. (1990) Photodestruction in higher plants by herbicide action. *J. Exp. Bot.* 41 (2):123-129.
- Bestman, H.D., Devine, M.D., Born, W.H.V. (1990) Herbicide chlorsulfuron decreases assimilate transport out of treated leaves of field pennycress (*Thiaspi arvense* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 93 (4):1441-1448.
- Chase, C.A., Bewick, T.A., Shilling, D.G. (1998) Differential photosynthetic electron transport and oxidative stress in paraquat-resistance and sensitive biotypes of *Solanum americanum*. *Pest. Biochem. Physiol.* 60 (1):63-90.
- Christoffoleti, P.J., Shincariol, V., Coelho, J.V.G. (1997) Controle da rebrota de tocos de eucalipto através do herbicida imazapyr. *Resumos do Congresso Brasileiro de Ciência das Plantas Daninhas*, 21, Caxambu: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, v.1, p. 287.
- Clark, R.B. (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.* 23 (3):458-460.
- Conner, A.J., Abernethy, D.J., Dastgheib, F., Field, R.J. (1994) *Brassica napus* mutants with chlorsulfuron resistance. Proceedings of 47th New Zealand Plant Protection Conference, 47:173-177.
- Dantas, F.W.F., Souza, A.J., Di Cierro, A. (2001) Controle da rebrota de eucalipto em área de reflorestamento. *Anais do Seminário Nacional sobre Herbicidas e Tecnologia de Aplicação em Florestas*, 1, 1999, Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais. p. 29-44.
- Devine, M.D., Bestman, H.D., Vanden Born, W.H. (1990) Physiological basis for the different phloem motilities of chlorsulfuron and chopryalid. *Weed Sci.* 38 (1):1-9.

- Edreva, A. (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agric. Ecosyst. Environ.* 106 (1):119-133.
- Egner, U., Gerbling, K.P., Hoyer, G.A., Krüger, G., Wegner, P. (1996) Design of inhibitors of photosystem II using a model of the D1 protein. *Pestic. Sci.* 47 (2):145-158.
- Fayez, K.A. (2000) Action of photosynthetic diuron herbicide on cell organelles and biochemical constituents of the leaves of two soybean cultivars. *Pestic. Biochem. Physiol.* 66 (2):105-115.
- Ferreira, M.J., Van-der-Merwe, C.F., Reinhardt, C.F. (1999) Ultrastructural changes caused by post-emergence herbicides in leaves of Bengal wandering jew (*Commelina benghalensis* L.). *South African J. Plant Soil*, 16 (1):18-23.
- Fuerst, E.P., Norman, M.A. (1991) Interaction of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci.* 39 (3):458-464.
- Gaston, S., Ribas-Carbo, M., Busquets, S., Berry, J.A., Zabalza, A., Royuela, M. (2003) Changes in mitochondrial electron partitioning in response to herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis in soybean. *Plant Physiol.* 133 (3):1351-1359.
- Hall, L.M., Devine, M.D. (1993) Chlorsulfuron inhibition of phloem translocation in chlorsulfuron-resistant and -susceptible *Arabidopsis thaliana*. *Pest. Biochem. Physiol.* 45 (2):81-90.
- Hansen, H., Grossmann, K. (2000) Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiol.* 124 (3):1437-1448.
- ISU – Iowa State University (2006) Herbicides – ALSase Inhibitors: Imidazolinones;
<http://www.agron.iastate.edu/~Weeds/ag317/manage/herbicide/imi.html> em 30/01/2006. Página mantida pelo Department of Agronomy - Iowa State University.
- James, E.K., Olivares, F.L., Reis, V.M., Baldani, J.I. (1994) Infection of sugarcane by nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J. Exp. Bot.* 45 (6):757-766.
- Liebl, R., Bridges, D.C. (2000) Imidazolinones and pyrimidyl-oxy-benzoates. In: Purdue University (org.), *Herbicide Action Course*, Indiana: Purdue University, p. 385-394.

- Lotan, T., Fluhr, R. (1990) Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway of induction. *Plant Physiol.* 93 (2):811-817.
- Moorhead, D.J. - Forest Herbicides;
http://www.ent.uga.edu/pmh/Trees/forest_herbicides.htm em 30/01/2006.
Página mantida por Georgia Pest Management Handbook.
- Niyogi, K.K. (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (2):333-359.
- Ovidi, E., Gambellini, G., Taddei, A.R., Cai, G., Del Casino, C., CECI, M., Rondín, S., Tiezzi, A. (2001) Herbicides and the microtubular apparatus of *Nicotiana tabacum* pollen tube: immunofluorescence and immunogold labelling studies. *Toxicol. Vitro*, 15 (2):143-151.
- Pang, S.S., Guddat, L.W., Duggleb, R.G. (2003) Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. *J. Biol. Chem.* 278 (9):7639-7644.
- Pfannschmidt, T. (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.* 8 (1):33-41.
- Pline, W.A., Viator, R., Wilcut, J.W., Edmisten, K.L., Thomas, J., Wells, R. (2002) Reproductive abnormalities in glyphosate-resistant cotton caused by lower CP4-EPSPs levels in the male reproductive tissue. *Weed Sci.* 50 (4):438-447.
- Rich, P.R. (1996) Quinone binding sites of membrane proteins as target for inhibitors. *Pestic. Sci.* 47 (3):287-296.
- Romano, C.P., Cooper, M.L., Klee, H.I. (1993) Uncoupling auxin and ethylene effects in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, 5 (2):181-189.
- Saladin, G., Magné, C., Clément, C. (2003) Impact of flumioxazin herbicide on growth and carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Rep.* 21 (8):821-827.
- Shaner, D.L. (1988) Absorption and translocation of imazapyr in *Imperata cylindrica* (L.) Raeuschel and effects on growth and water usage. *Trop. Pest Manage.* 34 (2):388-392.

- Shaner, D.L., Reider, M.L. (1986) Physiological responses of corn (*Zea mays*) to AC 243,997 in combination with valine, leucine, and isoleucine. *Pestic. Biochem. Physiol.* 25 (2):248-257.
- Siedow, J.N., Umbach, A.L. (1995) Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell*, 7 (7):821-831.
- Silva, C.M.M., Ferreira, L.R., Ferreira, F.A., Miranda, G.V. (2004) Root exudation of imazapyr by eucalypt, cultivated in soil. *Planta Daninha*, 22 (1):109-116.
- Silva, C.M.M., Ferreira, L.R., Ferreira, F.A., Miranda, G.V. (2005) Root exudation of imazapyr by eucalypt in nutritive solution. *Revista Árvore*, 29 (6):915-920.
- Szibor, M., Richter, C., Ghafourifar, P. (2001) Redox control of mitochondrial functions. *Antioxid. Redox Signal*, 3 (3):515-523.
- Takahashi, A., Yamada, S., Yamada, H., Kawana, T. (2001) Mitotic disruption by a novel pyrimidine herbicide, NS-245852, in oat (*Avena sativa* L.) roots. *Weed Biol. Manag.* 1 (3):182-188.
- Taylor, N.L., Rudhe, C., Hulett, J.M., Lithgow, T., Glaser, E., Day, D.A., Millar, A.H., Whelan, J. (2003) Environmental stress inhibit and stimulate different protein import pathways in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 547 (1-3):125-130.
- van Lis, R., Atteia, A. (2004) Control of mitochondrial function via photosynthetic redox signals. *Photosynth. Res.* 79 (1):133-148.
- Warabi, E., Usui, K., Matsumoto, H. (2002) Differential accumulation of protoporphyrin IX between oxyfluorfen resistant and non-resistant soybean cell lines. *J. Pestic. Sci.* 27 (2):106-110.

3.2. INTERAÇÃO IMAZAPYR E UM ANÁLOGO DE BRASSINOSTERÓIDE EM MUDAS DE *Eucalyptus grandis*

RESUMO

A aplicação de compostos exógenos à planta pode causar alterações nas concentrações hormonais endógenas. Visando avaliar a interação de um análogo espirostânico da castasterona (BB16) e o herbicida imazapyr, foi realizado um ensaio utilizando-se mudas clonais de *Eucalyptus grandis*, em sistema hidropônico. Para a aplicação de BB16, utilizaram-se borrifadores manuais e, para o herbicida, um pulverizador costal pressurizado a CO₂. O experimento foi constituído de seis tratamentos: controle; imazapyr (I) (0,750 kg ha⁻¹ do ingrediente ativo); BB16 nas concentrações de 0,08 (BB16(-)) e 0,16 mg L⁻¹ (BB16(+)) aplicado imediatamente após o herbicida (I + BB16(-) e I + BB16(+), respectivamente) e, imazapyr aplicado imediatamente após o BB16 (BB16(-) + I e BB16(+)+ I, respectivamente). Avaliaram-se a altura das mudas e o diâmetro do caule, além da determinação das biomassas secas de parte aérea e raízes. Pôde ser verificada total necrose das folhas terminais dos ramos apicais em I, BB16(-) + I e BB16(+)+ I, 18 dias após aplicação dos tratamentos (DAT). Aos 21 DAT, a testemunha, I + BB16(-) e I + BB16 (+) apresentaram maiores incrementos nas variáveis analisadas, em relação ao tratamento I, sendo este superior a BB16(-) + I e BB16(+)+ I. Os resultados obtidos neste trabalho, permitem inferir que o análogo

da castasterona possa agir como antídoto em mudas de *E. grandis* submetidas à ação de imazapyr, quando aplicado imediatamente após o herbicida, pois estas mudas não apresentaram sintomas de intoxicação sob esta condição.

INTERACTION OF IMAZAPYR AND A BRASSINOSTEROID ANALOGUE IN SEEDLINGS OF *Eucalyptus grandis*

ABSTRACT

The exogenous compounds application on the plant may induce alterations in the endogenous phytohormones levels. An experiment was carried out with the purpose of evaluating the interaction of the spirostanic analogue of castasterone (BB16) and the imazapyr herbicide, under hydroponic conditions, making use of seedlings clones of *Eucalyptus grandis*. It was used manual sprayers to the application of BB16, and to the herbicide application was used a CO₂ pressurized backpack sprayer. The experiment was constituted of six treatments: control; imazapyr (I) (0.750 kg ha⁻¹ of active ingredient); BB16 in the concentrations of 0.08 (BB16(-)) and 0.16 mg L⁻¹ (BB16(+)) applied immediately after the herbicide (I + BB16(-) and I + BB16(+), respectively) and, imazapyr applied immediately after the BB16 (BB16(-) + I and BB16(+) + I, respectively). The seedling height and the stem diameter were evaluated, and, at the end of the experiment, it was determined the dry matter of the shoot and roots. It was verified total necrosis in terminal leaves of the apical branches in I, BB16(-) + I and BB16(+) + I, 18 days after treatment application (DAT). After 21 DAT, the control, I + BB16(-) and I + BB16 (+) expressed the greatest increments at analyzed variables in relation to treatment I, and this was superior to BB16(-) + I and BB16(+) + I. As a result of this trial, it is probable that the analogue of castasterone may act as safener in seedlings of the *E. grandis* submitted to the imazapyr action, when immediately applied after the herbicide, because these seedlings did not exhibit intoxication symptoms under this condition.

INTRODUÇÃO

O imazapyr (ácido (+/-)-2-[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-3-piridina carboxílico) é um herbicida do grupo químico das imidazolinonas, constituído por um grupamento imidazolina covalentemente ligado a um ácido piridinecarboxílico e formulado em sal de isopropilamina (Cyanamid, 1983). Este herbicida apresenta amplo espectro de ação (Lee et al., 1991), sendo utilizado no controle de plantas daninhas anuais e perenes em áreas não-agrícolas (Beardmore et al., 1991), em cultivos com coníferas (Boyd et al., 1995) e no controle de brotações em eucaliptais (Little et al., 1998). Neste último caso, apresenta alta eficiência de controle (acima de 90%) e maior flexibilidade de tempo entre a aplicação e o corte das árvores, em relação à aplicação de glyphosate (Dantas et al., 2001).

O mecanismo de ação caracteriza-se pela inibição da atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) ou acetohidroxiácido sintase (AHAS), que está envolvida na biossíntese de três aminoácidos alifáticos essenciais (encontrada somente em espécies vegetais): valina, leucina e isoleucina (Pang et al., 2003); por esse motivo, o imazapyr apresenta baixa intoxicação para mamíferos, com baixos riscos para a fauna silvestre (Gagne et al., 1991). Pode atuar sobre o “pool” de aminoácidos e da fração proteica, indicando que o herbicida desorganiza a síntese de proteínas, por alterar a taxa de giro proteico (Anderson e Hibberd, 1985). Essa inibição interrompe a síntese de proteínas, que, por sua vez, interfere na síntese de DNA e no crescimento celular, o que acarretará na morte das regiões meristemáticas, interrompendo o crescimento (Liebl e Bridges, 2000) e interferindo no uso eficiente da água (Shaner, 1988).

Os brassinosteróides (BRs), por sua vez, são essenciais para o desenvolvimento das plantas e causam significativas respostas no crescimento, incluindo expansão foliar, ativação de bombas de prótons, estímulo da síntese de etileno através da indução da ACCsintase, diferenciação e divisão de células, com conseqüente alongamento celular (Clouse e Sasse, 1998). Os BRs, de forma geral, participam de processos de tolerância das plantas a diversos tipos de estresse (Krishna, 2003). Idêntica tolerância tem sido verificada com relação aos análogos de BRs (Mazorra e Núñez, 2000; Mazorra et al., 2002). O análogo espirostanico da castasterona ((25R)-2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona)), por

exemplo, confere tolerância aos estresses térmico e salino, em função do aumento da síntese de proteínas termoreguladoras e da atividade de enzimas antioxidantes, respectivamente (Núñez et al., 2003/4; González-Olmedo et al., 2005).

Os BRs, apesar de serem rapidamente absorvidos pela superfície foliar, quando aplicados exogenamente, apresentam transporte limitado. Para alguns autores, este hormônio não é transportado entre o tecido de origem e os demais (Bishop et al., 1999), enquanto outros, consideram o transporte a curtas distâncias (Symons e Reid, 2004), envolvendo alguns conjugados hidrolisáveis (Bajguz e Tretyn, 2003). Já o imazapyr é facilmente absorvido pelo sistema radicular e pelas folhas, sendo rapidamente translocado via xilema e floema para toda a planta (Shaner, 1988).

Alguns trabalhos têm sido realizados mostrando a inter-relação existente de BRs e outros hormônios, como ácido abscísico (ABA) (Ábrahám et al., 2003), etileno (Müssig et al., 2003) e jasmonato (Schaller et al., 2000). Contudo, ainda é incipiente os trabalhos relacionados à interação hormonal com produtos utilizados nos plantios comerciais, principalmente com relação a herbicidas, haja vista que a aplicação de compostos exógenos à planta pode causar alterações nas concentrações hormonais endógenas. É dentro deste contexto que se insere o objetivo deste trabalho, que foi verificar se BB16 (um análogo de BR) teria algum efeito protetor em mudas de eucalipto submetidas à aplicação do herbicida imazapyr.

MATERIAL E MÉTODOS

As mudas de *Eucalyptus grandis* utilizadas neste ensaio foram provenientes de propagação vegetativa (clone CAF01), com três meses de idade, e altura variando de 20 a 25 cm, produzidas em recipientes de polipropileno preto (tubetes) de 55 cm³ de capacidade, em substrato composto de casca de arroz carbonizada e vermiculita, na proporção de 1:1 v/v. O experimento foi instalado em sistema hidropônico utilizando-se vasos plásticos com 2,500 L de solução nutritiva, a qual teve o pH corrigido a cada dois dias para $5,50 \pm 0,10$, utilizando hidróxido de sódio ou ácido clorídrico para a correção. Os vasos receberam revestimento prateado nas paredes externas e foram envoltos internamente por

camada plástica transparente. As tampas destes apresentavam duas perfurações com diâmetros de 14 mm (sendo uma destas, utilizada para o recebimento da muda de eucalipto) e uma perfuração de 2 mm, destinada à passagem da mangueira condutora de aeração para a solução, ligada a um compressor com fluxo contínuo de ar.

No transplante foram utilizadas mudas homogêneas em altura, as quais tiveram o sistema radicular cuidadosamente lavado e, de imediato, transferidas para solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), sendo uma muda por vaso, onde permaneceram por 32 dias (fase de adaptação à solução) para emissão de novas folhas e raízes. A solução nutritiva foi trocada semanalmente, sendo a última troca no dia anterior à aplicação foliar dos compostos. Para a aplicação de BB16 utilizaram-se borrifadores manuais e para aplicação do herbicida, um pulverizador costal pressurizado a CO₂ com 30 lb pol⁻² e volume de calda de 200 L ha⁻¹, equipado com um bico de jato plano (tipo leque) Teejet DG95.02 EVS, tendo-se o cuidado prévio de cobrir a superfície dos vasos com dupla camada plástica, para evitar a contaminação da solução nutritiva.

Os compostos exógenos utilizados foram constituídos pelo herbicida imazapyr, na dose 0,750 kg ha⁻¹ do ingrediente ativo, aplicado antes, ou após, a aplicação de 50 mL/muda de BB16 (análogo espirostanico da castasterona – (25R)-2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona), este em duas concentrações (0,08 e 0,16 mg L⁻¹), sendo estas simbolizadas por BB16(-) e BB16(+), respectivamente. O experimento foi composto de seis tratamentos: controle (sem aplicação de BB16 ou imazapyr); imazapyr; BB16, em ambas concentrações, com a aplicação imediatamente após o herbicida (I+BB16(-) e I+BB16(+), respectivamente) e imazapyr, com a aplicação imediatamente após o BB16, este nas concentrações de 0,08 ou 0,16 mg L⁻¹ (BB16(-)+I e BB16(+)+I, respectivamente). O segundo composto foi aplicado somente quando as folhas haviam secado, para que não ocorresse escorrimento superficial do produto previamente aplicado.

As avaliações consistiram de cinco medições diárias (às 8, 10, 12, 14 e 16 horas) do teor relativo de clorofila na terceira folha totalmente expandida (da parte apical para base da muda), desde o dia da aplicação dos tratamentos (DAT) até 35 dias após, utilizando-se um medidor portátil de clorofila (modelo SPAD-502 - Soil Plant Analysis Development, Minolta), tomando-se a média de cinco medições da mesma folha em cada horário de avaliação. Foram realizadas

avaliações semanais de altura (relativa à distância entre o colo e a inserção da folha mais nova no ápice da muda) e diâmetro (medido a 2,5 cm do colo da muda) utilizando-se uma régua graduada e um paquímetro digital, respectivamente, além de avaliações visuais de intoxicação documentadas através de fotografias. A determinação da biomassa seca de parte aérea e do sistema radicular foi realizada 35 DAT, quando foram individualizadas parte aérea e raízes, acondicionando-as separadamente em sacos de papel e colocadas em estufa com circulação de ar, a 72 ± 1 °C, por 72 horas.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas no tempo (épocas de avaliações biométricas) com seis tratamentos, correspondentes à testemunha, à dose do herbicida e à interação desta com as doses de BB16 (aplicado antes ou após o imazapyr), e cinco repetições. A análise de variância foi realizada, utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS, 1999), após ter-se verificado as pressuposições da mesma (Demétrio, 1978) e, quando o teste F foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as mensurações diárias, os valores do medidor portátil de clorofila (SPAD) não apresentaram variações, em relação ao horário de medição, o que confirma as observações de Reis (2003) na cultura do mamão. Por este motivo, foram tomadas as medidas obtidas às 16 horas como representativas do dia de avaliação. No entanto, ao longo do período experimental, houve variação significativa dos valores de SPAD para os tratamentos que receberam a aplicação prévia de BB16 (em ambas concentrações), em relação aos demais.

A partir do oitavo DAT não foi possível fazer as leituras de SPAD no tratamento BB16(-) + I em decorrência da desidratação total da folha-medida, o que se repetiu para o tratamento BB16(+) + I a partir do 11º DAT (Figura 1). Verificou-se, entretanto, que nestes tratamentos, o início de desidratação das folhas foi a partir do ápice do limbo foliar, com evolução do sintoma em direção a base da folha. Em decorrência da mensuração com SPAD ter sido realizada no terço inferior do limbo foliar, é provável que com a evolução da desidratação

tenha havido migração de cloroplastos para as áreas assintomáticas, como ocorre quando as folhas são submetidas ao estresse por luz (DeBlasio et al., 2003), promovendo altas concentrações de clorofilas nestas regiões, o que pode ter provocado elevação dos valores SPAD, verificados ao quarto DAT.

O SPAD, que permite leituras instantâneas do teor relativo de clorofila na folha sem destruí-la (Argenta et al., 2001), não detectou variação de coloração da folha-medida no tratamento que recebeu somente a aplicação de imazapyr (Figura 1), apesar das alterações verificadas nas demais variáveis analisadas. Todavia, foi verificado que, sob a aplicação do herbicida, as folhas mais novas (dos ramos apicais) ao quarto DAT apresentaram coloração avermelhada nos bordos do limbo foliar, sintoma este que evoluiu para enegrecimento do mesmo, culminando com a desidratação total do limbo destas folhas.

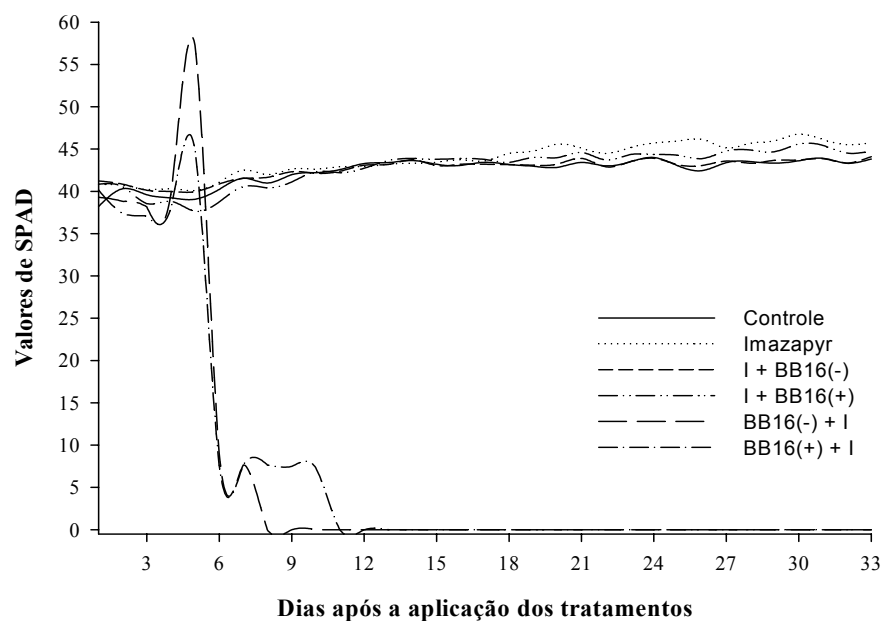


Figura 1 – Valores do conteúdo relativo de clorofila (SPAD) na terceira folha totalmente expandida de mudas de *Eucalyptus grandis*, em relação aos dias após a aplicação dos tratamentos.

Uma vez que o imazapyr inibe a atividade da ALS e, por conseguinte, interfere na síntese de proteínas, o local de maior ação deste herbicida são os meristemas apicais, razão pela qual, os sintomas de intoxicação causados por este herbicida são percebidos, primariamente, nestas regiões. O início de enegrecimento dos bordos do limbo foliar nas brotações mais novas do ápice caulinar, das mudas que receberam a aplicação de imazapyr após a de BB16 (em

ambas concentrações), pôde ser percebido aos três DAT. Com a evolução deste sintoma, verificou-se irradiação do mesmo ao longo do limbo, com posterior necrose do tecido, fruto da ação sinérgica do análogo de brassinosteróide com o herbicida. Já aos 18 DAT pôde ser verificada total necrose das folhas terminais dos ramos apicais nos tratamentos constituídos da aplicação de imazapyr, isolado ou precedido da pulverização das folhas com BB16 (ambas concentrações) (Figura 2).

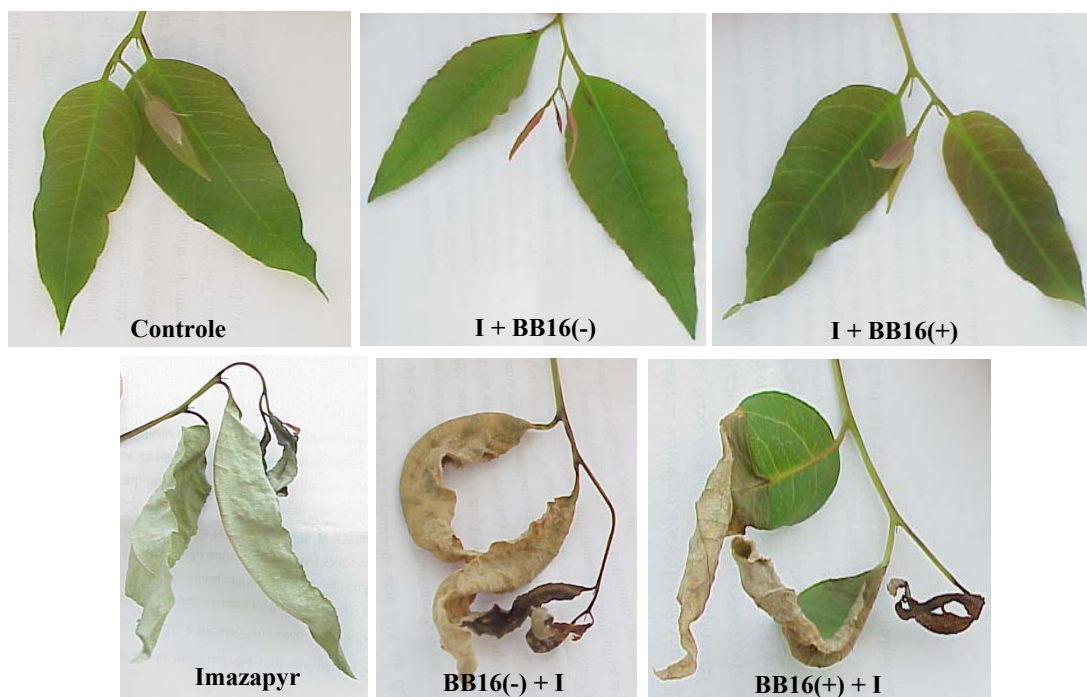


Figura 2 – Sintomas visuais de intoxicação nas folhas terminais dos ramos apicais de mudas de *Eucalyptus grandis*, aos 18 DAT.

Na primeira semana de avaliação, foi possível verificar, mediante análise da variável diâmetro, que os tratamentos que receberam a aplicação prévia de BB16 (independente de sua concentração) diferiram estatisticamente dos demais; o mesmo não foi verificado sob a análise da variável altura, onde não houve diferença entre os tratamentos na primeira semana de avaliação. Todavia, nas semanas seguintes, a testemunha e os tratamentos I + BB16(-) e I + BB16(+) apresentaram maiores incrementos nas variáveis biométricas analisadas, em relação ao tratamento representado pela aplicação somente de imazapyr, sendo superior a BB16(-) + I e BB16(+) + I (Figura 3).

Como as variações para diâmetro e altura não foram significativamente diferentes, ao longo das avaliações, para os tratamentos BB16(-) + I e BB16(+) + I, adotou-se a média dos valores neste período.

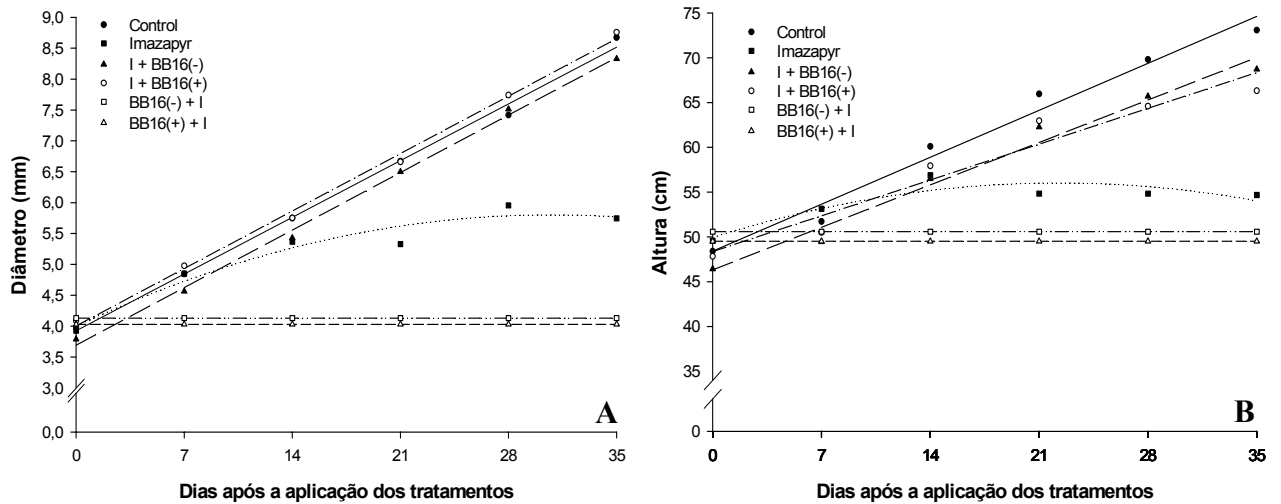


Figura 3 – Diâmetro (A) e altura (B) de mudas de *Eucalyptus grandis*, ao longo dos 35 dias de avaliação.

Com relação ao ganho de biomassa seca do sistema radicular, ao longo do período experimental, os tratamentos que receberam a aplicação somente de imazapyr e os tratamentos BB16(-) + I e BB16(+) + I não diferiram entre si. Entretanto, foram significativamente inferiores aos demais tratamentos, tendo-se observado, para estes últimos, comportamento semelhante (Figura 4A). Todavia, quanto à biomassa seca da parte aérea, o tratamento composto pela aplicação somente do herbicida refletiu em maior biomassa em relação a BB16(-) + I e BB16(+) + I, sendo, contudo, inferior a biomassa apresentada quando as mudas foram tratadas com aplicação de I + BB16(-) ou I + BB16(+) (Figuras 4B e 5).

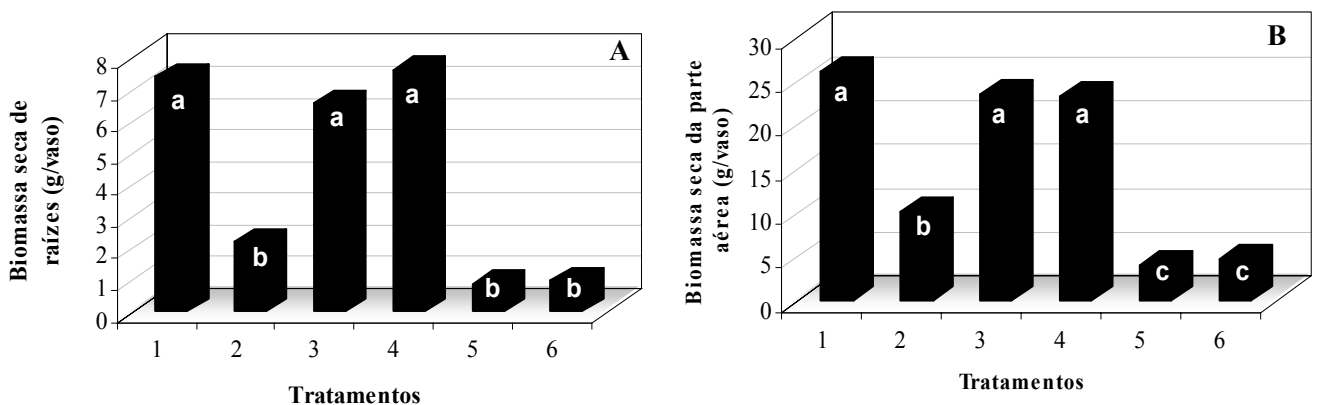


Figura 4 – Biomassa seca do sistema radicular (A) e da parte aérea (B) de mudas de *Eucalyptus grandis* aos 35 DAT: testemunha (1), imazapyr (2), I + BB16(-) (3), I + BB16(+), BB16(-) + I (5) e BB16(+) + I (6).

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

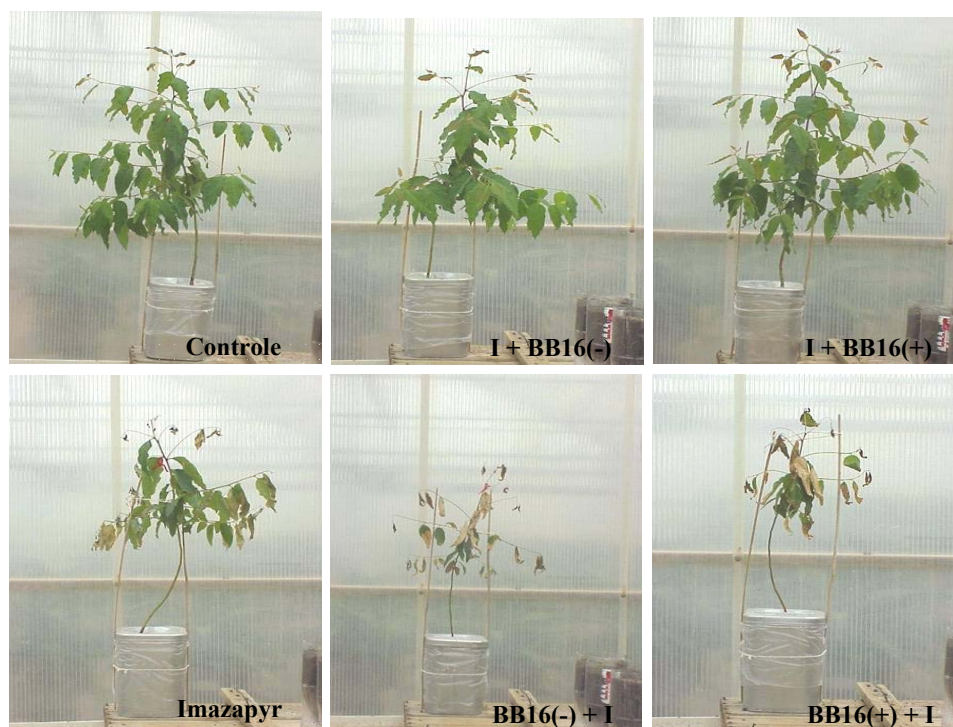


Figura 5 – Sintomas visuais de intoxicação em mudas de *Eucalyptus grandis* por imazapyr, associado ou não, à aplicação do análogo de brassinosteróide, aos 22 DAT.

Uma das importantes características dos brassinosteróides (BR) é seu potencial de aumentar a tolerância de plantas a um amplo espectro de estresses. Apesar disso, poucos estudos têm sido realizados visando elucidar o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) os BR promovem essa tolerância nas plantas (Krishna, 2003). Neste ensaio foi observada completa ausência de sintomas visuais de intoxicação em mudas que receberam a aplicação de BB16 após a de imazapyr.

Mudanças fisiológicas ocorridas após a aplicação de imazapyr incluem acúmulo de α -oxobutirato ou derivados do processo de inibição da ALS, desequilíbrio no conteúdo de aminoácidos, inibição da síntese de DNA e da divisão celular, além de redução na translocação de fotoassimilados (Duggleby e Pang, 2000). Todavia, os efeitos dos herbicidas inibidores da ALS podem ser revertidos por suplementação com os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) (Chaleff e Mauvais, 1984; La Rossa e Schloss, 1984; Ray, 1984).

Como os brassinosteróides podem ser utilizados como substrato para enzimas de detoxificação, como as sulfotransferases (as quais constituem o primeiro passo no processo de defesa da planta à presença de agentes xenobióticos), devido à alta afinidade de BR com estas enzimas (Mulder e Jakoby, 1990), é possível que haja interação destes com a presença de produtos

aplicados exogenamente à planta. Marsolais et al. (2004) verificaram que a indução de genes que codificam uma sulfotransferase de *Brassica napus* (BNST) tem como substrato preferencial precursores de 24-epibrassinolida, 24-epicastasterona e 24-epiteasterona. Estes autores reportam que enzimas BNST, provavelmente, constituem um componente do sistema de detoxificação à aplicação de herbicidas em *B. napus* e, provavelmente, as sulfotransferases possam participar em reações de detoxificação de agentes químicos em algumas espécies.

Outros hormônios, como as giberelinas, têm o potencial de serem utilizados como antídotos à aplicação de herbicidas. Wilkinson (1988) verificou que a aplicação de GA₃ (ácido giberélico) em plântulas de soja reverteu os efeitos tóxicos causados por metolachlor (um herbicida inibidor da síntese de ácidos graxos de cadeias muito longas, pertencente à classe química das cloroacetanilidas). Sendo assim, a utilização de BB16 em mudas previamente submetidas ao estresse químico (aplicação de imazapyr), pode ter estimulado mecanismos de detoxificação, envolvendo possivelmente sulfotransferases, o que resultou em aspecto visual semelhante às mudas-controle.

O receptor de BRs (proteína BRI1 - Brassinolide insensitive 1 – mutante de *Arabidopsis* insensível a brassinosteróides), o qual está localizado na membrana plasmática (Friedrichsen et al., 2000), possui um domínio extracelular (N-terminal), que nada mais é do que um receptor rico em leucina (Bishop e Yokota, 2001), acoplado a um domínio transmembranar e um domínio serina/treonina cinase (C-terminal) no citoplasma, o qual é ativado através de fosforilação e serve para transdução do sinal após a interação do hormônio e do domínio N-terminal (Friedrichsen et al., 2000). Diversos autores têm apontado que a expressão de determinados grupos de genes é significativamente alterada pela aplicação de BR e, somente a identificação dos genes regulados por este hormônio pode ajudar a identificar as diferentes respostas observadas em plantas tratadas com BR (Clouse, 2002; Müssig et al., 2003). Portanto, a aplicação de imazapyr previamente a de BB16 pode ter promovido indução de genes que codificam a síntese de mais receptores para este hormônio, aumentando, assim, os sítios de ligação, acarretando em maior ação protetora sobre a planta em relação ao estresse químico produzido.

Contudo, as mudas que foram pulverizadas com BB16 (com posterior aplicação do herbicida) apresentaram sintomas visuais de intoxicação semelhantes aos apresentados pelas mudas sob aplicação somente de imazapyr. Logo, o pré-tratamento com o análogo de castasterona (BB16), apesar do mesmo ter sido aplicado poucos minutos antes do herbicida, não conferiu tolerância destas mudas ao imazapyr.

Comportamento semelhante foi verificado por Krishna (2003) ao avaliar a inter-relação brassinosteróides e a ação patogênica de *Verticillium dahliae* em plantas de tomate. Este autor observou que as raízes inoculadas com este patógeno e crescidas por 14 dias em presença de epi-brassinolídeo (EBR) não demonstraram sintomas, ou estes foram de pequena intensidade; todavia, as plantas não tratadas com EBR apresentaram moderado ou severo sintoma característico do processo de infecção deste fungo. A exposição das plântulas por curto espaço de tempo a EBR, antes da inoculação de *V. dahliae*, não reduziu os sintomas da doença, o que demonstra, que EBR só foi efetivo quando o patógeno já estava presente nos tecidos da planta.

A aplicação prévia de BR pode ter induzido a síntese de proteínas através do estímulo na transcrição de RNAm (Hu et al., 2000) e, como grande parte destas são constituídas dos aminoácidos ramificados leucina, isoleucina e valina, pode ter ocorrido elevação do conteúdo de ALS nas células e, conseqüentemente, maior quantidade de substrato para atuação dos herbicidas inibidores desta enzima, logo, maior velocidade de atuação destes.

CONCLUSÕES

Neste ensaio verificou-se que BB16, um análogo de brassinosteróide, reduziu os efeitos tóxicos às mudas *E. grandis* tratadas com imazapyr, quando o hormônio foi aplicado imediatamente após o herbicida. Em virtude disto, estas mudas não apresentaram sintomas visuais de intoxicação, além de não diferirem estatisticamente quanto à altura, diâmetro e biomassas seca da parte aérea e do sistema radicular, em relação ao tratamento controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ábrahám, E., Rigo, G., Szekely, G., Nagy, R., Koncz, C., Szabados, L. (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 51 (3):363-372.
- Anderson, P.C., Hibberd, K.A. (1985) Evidence of the interaction of an imidazolinone herbicide with leucine, valine and isoleucine metabolism. *Weed Sci.* 33 (4):479-483.
- Argenta, G., Silva, P.R.F., Bortolini, C.G., Forsthofer, E.L., Strieder, M.L. (2001) Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13 (2):158-167.
- Bajguz, A., Tretyn, A. (2003) The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, 62 (7):1027-1046.
- Beardmore, R.A., Hart, R., Iverson, R., Risley, M.A., Trimmer, M. (1991) Imazapyr herbicide. In: Shaner, D.L., O'Connor, S.L. (eds.) *The Imidazolinone Herbicides*. Boca Raton: CRC Press Inc., p. 211-227.
- Bishop, G.J., Nomura, T., Yokota, T., Harrison, K., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Jones, J.D.G., Kamiya, Y. (1999) The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (4):1761-1766.
- Bishop, G.J., Yokota, T. (2001) Plant steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant Cell Physiol.* 42 (2):114-120.
- Boyd, R.S., Freeman, J.D., Miller, J.H., Edwards, M.B. (1995) Forest herbicide influences on floristic diversity seven years after broadcast pine release treatments in central Georgia, USA. *New For.* 10 (1):17-34.
- Chaleff, R.S., Mauvais, C.J. (1984) Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science*, 224 (4656):1443-1445.
- Clark, R.B. (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.* 23 (3):458-460.
- Clouse, S.D., Sasse, J.M. (1998) Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 49:427-451.
- Clouse, S.D. (2002) Brassinosteroid signal transduction, Clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. *Mol. Cell*, 10 (5):973-982.

- Cyanamid (1983) *AC-252,925 broad-spectrum herbicide for industrial sites and railways*. Tech. Rep. American Cyanamid Company, Agric. Res. Div., Princeton, New Jersey, USA. 14p.
- Dantas, F.W.F., Souza, A.J., Di Cierro, A. (2001) Controle da rebrota de eucalipto em área de reflorestamento. *Anais do Seminário Nacional sobre Herbicidas e Tecnologia de Aplicação em Florestas*, 1, Viçosa: UFV, p. 29-44.
- DeBlasio, S.L., Mullen, J.L., Luesse, D.R., Hangarter, R.P. (2003) Phytochrome modulation of blue light-induced chloroplast movements in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133 (4):1471-1479.
- Demétrio, C.G.B. (1978) *Transformação de dados: efeitos sobre a análise de variância*. Dissertação (Mestrado em Experimentação e Estatística) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, 113p.
- Duggleby, R.G., Pang, S.S. (2000) Acetohydroxyacid synthase. *J. Biochem. Mol. Biol.* 33 (1):1-36.
- Friedrichsen, D.M., Joazeiro, C.A., Li, J., Hunter, T., Chory, J. (2000) Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* 123 (4):1247-1256.
- Gagne, J.A., Fischer, J.E., Sharma, R.K., Traul, K.A., Diehl, S.J., Hess, F.G., Harris, J.E. (1991) Toxicology of the imidazolinone herbicides. In: Shaner DL, O'Connor SL (eds.), *The Imidazolinone Herbicides*, Boca Raton: CRC Press Inc., p. 179-182.
- González-Olmedo, J.L., Córdova, A., Aragón, C.E., Pina, D., Rivas, M., Rodríguez, R. (2005) Effect of an analogue of brassinosteroid on FHIA-18 plantlets exposed to thermal stress. *InfoMusa*, 14 (1):18-20.
- Hu, Y., Bao, F., Li, J. (2000) Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24 (5):693-701.
- Krishna, P. (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.* 22 (4):289-297.
- La Rossa, R.A., Schloss, J.V. (1984) The sulfonylurea herbicide sulfoneturon methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 259 (14):8753-8757.

- Lee, A., Gatterdam, P.E., Chiu, T.Y., Mallipudi, M., Fiala, R.R. (1991) Plant metabolism. *In: Shaner DL, O'Connor SL (eds.), The Imidazolinone Herbicides*, Boca Raton: CRC Press Inc., p. 151-165.
- Liebl, R., Bridges, D.C. (2000) Imidazolinones and pyrimidyl-oxy-benzoates. *In: Purdue University (org.), Herbicide Action Course*, Indiana: Purdue University, p. 385-394.
- Little, K., Maxfield, M., Kritzing, J. (1998) Control of *Eucalyptus grandis* cut stumps. *ICFR Bull. Ser. n.2*, 15p.
- Marsolais, F., Hernández-Sebastià, C., Rousseau, A., Varin, L. (2004) Molecular and biochemical characterization of BNST4, an ethanol-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*, and regulation of BNST genes by chemical stress and during development. *Plant Sci.* 166 (6):1359-1370.
- Mazorra, L.M., Núñez, M. (2000) Brassinosteroid analogues differentially modify peroxidase activity, superoxide dismutase activity and protein content in tomato seedlings. *Cult. Trop.* 21 (1):29-34.
- Mazorra, L.M., Núñez, M., Hechavarría, M., Coll, F., Sánchez-Blanco, M.J. (2002) Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Biol. Plant.* 45 (4):593-596.
- Mulder, G.J., Jakoby, W.B. (1990) Sulfation. *In: Mulder, G.J. (ed.), Conjugation reactions in drug metabolism*, pp.107-161. Taylor and Francis, London, England.
- Müssig, C., Shin, G.-H., Altmann, T. (2003) Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133 (3):1261-1271.
- Núñez, M., Mazzafera, P., Mazorra, L.M., Siqueira, W.J., Zullo, M.A.T. (2003/4). Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. *Biol. Plant.* 47 (1):67-70.
- Pang, S.S., Guddat, L.W., Duggleb, R.G. (2003) Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. *J. Biol. Chem.* 278 (9):7639-7644.
- Ray, T.B. (1984) Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis of plants. *Plant Physiol.* 75 (3):827-831.
- Reis, F. de O. (2003) *Trocas gasosas, eficiência fotoquímica e fluxo de seiva xilemática em mamoeiro do grupo "Formosa" cultivado em condições de campo na região Norte Fluminense*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 59p.

- SAS (1999) SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Version Eight.
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T., Weiler, E.W. (2000) 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*, 210 (6):979-984.
- Shaner, D.L. (1988) Adsorption and translocation of imazapyr in *Imperata cylindrica* (L.) Raeuschel and effects on growth and water usage. *Trop. Pest Manag.* 34 (2):388-392.
- Symons, G.M., Reid, J.B. (2004) Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. *Plant Physiol.* 135 (4):2196-2206.
- Wilkinson, R.E. (1988) Metolachlor [2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl) acetamide] inhibition of gibberellin precursor biosynthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 32 (1):25-37.

3.3. INTERFERÊNCIA DOS HERBICIDAS GLYPHOSATE E IMAZAPYR, ASSOCIADOS A UM ANÁLOGO DE BRASSINOSTERÓIDE, NO APARATO FOTOSSINTÉTICO DE MUDAS DE *Eucalyptus grandis*

RESUMO

Os efeitos da aplicação dos herbicidas imazapyr e glyphosate e as suas interações com um análogo espirosteróide da castasterona (BB16), no crescimento de mudas clonais de *Eucalyptus grandis*, foram avaliados através de ensaio em sistema hidropônico. Utilizou-se um pulverizador costal pressurizado a CO₂ para aplicação de BB16 (nas concentrações de 0,08 e 0,16 mg L⁻¹, BB16(-) e BB16(+) respectivamente) e para as aplicações de imazapyr (0,750 kg ha⁻¹ i.a.) e de glyphosate (1,440 kg ha⁻¹ i.a.). Os tratamentos foram constituídos pelo controle, BB16(-), BB16(+), glyphosate, imazapyr, além da interação hormônio-herbicida, em intervalo de 12 horas entre a aplicação de BB16 e de cada herbicida, e vice-versa. A mensuração da fluorescência da clorofila *a* foi realizada duas vezes ao dia, na terceira folha totalmente expandida, além das avaliações de altura, diâmetro e biomassas secas da parte aérea (BSPA) e raízes (BSR). O controle, BB16(-) e BB16(+) diferiram dos demais tratamentos para BSPA, contudo, para BSR, altura e diâmetro não houve diferença significativa entre os tratamentos. As médias dos parâmetros de fluorescência, obtidas para os tratamentos que receberam a aplicação dos herbicidas, foram inferiores ao controle, BB16(-) e

BB16(+). Ao final do ensaio, as mudas que receberam glyphosate apresentavam-se necróticas, enquanto as que receberam imazapyr associado ao BB16, manifestaram apenas extremidades dos ramos laterais necrosadas. Os herbicidas testados causaram efeitos deletérios no aparato fotossintético de *E. grandis*, todavia a aplicação de BB16 associada a imazapyr foi capaz de diminuir a intoxicação causada por este herbicida.

INTERFERENCE OF IMAZAPYR AND GLYPHOSATE HERBICIDES,
ASSOCIATED TO A BRASSINOSTEROID ANALOGUE, IN PHOTOSYNTHETIC
APPARATUS OF *Eucalyptus grandis* SEEDLINGS

ABSTRACT

The effects of imazapyr and glyphosate applications and, the interaction of these with a spirostanoic analogue of castasterone (BB16), in the growth of seedling clones of *Eucalyptus grandis* were evaluated through an assay under hydroponic system. It was used a CO₂ pressurized backpack sprayer to the BB16 application (in the concentrations of 0.08 and 0.16 mg L⁻¹, BB16(-) and BB16(+) respectively) and the same sprayer was used to the applications of imazapyr (0.750 kg ha⁻¹ a.i.) and glyphosate (1.440 kg ha⁻¹ a.i.). The treatments were constituted of control, BB16(-), BB16(+), glyphosate, imazapyr besides the hormone-herbicide interaction, in a break of 12 hours between the BB16 application and of each one of the herbicides and, vice versa. The chlorophyll a fluorescence measurement was realized twice a day in the third youngest totally expanded leaf besides the evaluations of height, diameter and dry matter of the shoot (DMS) and roots (DMR). The control, BB16(-) and BB16(+) differed from the other treatments to DMS; however, to DMR, height and diameter did not have significant difference among the treatments. The means of the fluorescence parameters, obtained for the treatments that received the herbicides application, were lower in relation to control, BB16(-) and BB16(+). At the end of the assay, the seedlings that received the glyphosate exhibited necrosis, while the seedlings that received imazapyr associated to BB16, showed only necrotic lesion in the terminal of the lateral branches. The herbicides analyzed caused deleterious effects in the photosynthetic

apparatus of the *E. grandis*, however the BB16 application associated to imazapyr was able to decrease the intoxication caused by this herbicide.

INTRODUÇÃO

No processo fotossintético, a luz é absorvida por pigmentos do complexo-antena, que excitados, transferem energia para os centros de reação dos fotossistemas I e II (P_{700} e P_{680} , respectivamente) (Young e Frank, 1996). Quando ocorre excesso de energia, esta pode ser dissipada na forma de fluorescência da clorofila (Krause e Winter, 1996), sendo esta uma das formas de monitoramento da inibição ou redução na transferência de elétrons entre os fotossistemas da planta sob estresse. A redução na dissipação da energia pelo processo fotoquímico é refletida por incremento correspondente na fluorescência, a qual pode ser observada ainda em folhas intactas (Maxwell e Johnson, 2000). Em função da aplicação de herbicidas, mesmo quando o sintoma ainda não é visível, ocorrem injúrias causadas ao aparelho fotossintético, reduzindo a capacidade de realização de fotossíntese pela planta, e esta alteração pode ser avaliada através da análise da fluorescência da clorofila *a* (Catunda et al., 2005).

A mensuração de fluorescência é um método rápido, simples e não-invasivo, sendo largamente utilizada no entendimento dos mecanismos da fotossíntese, bem como na avaliação da capacidade fotossintética alterada por estresses bióticos ou abióticos pelos quais as plantas possam passar, como temperatura (Oliveira et al., 2002), radiação (Mazza et al., 2000), deficiência hídrica (Roden e Ball, 1996) ou mineral (Castro, 2005), salinidade (Belkhodja et al., 1994), presença de insetos (Bown et al., 2002) ou fungos (Peterson e Aylor, 1995) e herbicidas (Ireland et al., 1986). Para este tipo de avaliação são utilizados fluorômetros de luz modulada (Schreiber et al., 1996), cujas aplicações variam desde a rápida identificação de injúrias causadas ao aparelho fotossintético, até análise detalhada da alteração da capacidade fotossintética da planta. Uma das grandes vantagens do uso deste método é o fato da medição não ser destrutiva, sendo possível de ser realizada tanto em laboratório quanto em campo.

Utilizando um fluorômetro de luz modulada obtêm-se os valores de F_0 , que representa a fluorescência inicial correspondente à fração da energia

absorvida pelo complexo-antena e não transmitida, portanto, não absorvida pelos pigmentos fotossintéticos (Rascher et al., 2000); F_m , que é a fluorescência máxima e; a relação F_v/F_m , que representa o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PS II). A relação F_v/F_m pode variar de 0,75 a 0,85 em plantas não submetidas a estresses (Bòlhar-Nordenkamph et al., 1989), sendo a redução desta razão um excelente indicador de efeito fotoinibitório quando as plantas estão submetidas ao estresse químico (Araus e Hogan, 1994).

Objetivando-se avaliar os efeitos no aparato fotossintético e no crescimento de mudas *Eucalyptus grandis* em decorrência da aplicação dos herbicidas imazapyr (inibidor da enzima acetolactato sintase) e glyphosate (inibidor da enzima 3-enoilpiruvilxiquimato-5-fosfato sintase) e, a suas interações com um análogo de brassinosteróide, foi realizado um ensaio em condições de casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em sistema hidropônico, utilizando-se vasos plásticos com 2,500 L de solução nutritiva, a qual teve o pH corrigido a cada dois dias para $5,50 \pm 0,10$. Os vasos receberam revestimento prateado nas paredes externas e foram envoltos internamente por camada plástica transparente. As tampas destes apresentavam duas perfurações com diâmetros de 14 mm (sendo uma destas, utilizada para o recebimento da muda de eucalipto) e uma perfuração de 2 mm, destinada à passagem da mangueira condutora de aeração para a solução, ligada a um compressor com fluxo contínuo de ar.

As mudas de eucalipto utilizadas foram provenientes de propagação vegetativa (clone CAF13), com 105 dias de idade e altura média de 32,8 cm, produzidas em recipientes de polipropileno preto (tubetes) de 55 cm³ de capacidade, com substrato composto de casca de arroz carbonizada e vermiculita na proporção de 1:1 v/v.

No transplante foram utilizadas mudas homogêneas em altura, as quais tiveram o sistema radicular cuidadosamente lavado e, de imediato, transferidas para solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), sendo uma muda por vaso, onde permaneceram por 60 dias (fase adaptativa), para emissão de novas folhas e raízes. A solução nutritiva foi trocada semanalmente, sendo a última troca no dia

da aplicação foliar dos compostos, esta realizada com pulverizador costal pressurizado a CO₂ com 30 lb pol⁻² e volume de calda de 200 L ha⁻¹, equipado com um bico de jato plano (tipo leque) Teejet DG95.02 EVS, tendo-se o cuidado prévio de cobrir a superfície dos vasos com dupla camada plástica, para evitar a contaminação da solução nutritiva.

Os compostos exógenos aplicados foram constituídos pelos herbicidas glyphosate e imazapyr, na dosagem de 1,440 e 0,750 kg ha⁻¹ do ingrediente ativo, respectivamente. Além da aplicação do hormônio BB16 (BIOBRAS-16, análogo espiroestano da castasterona – (25R)-2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona), este em duas concentrações (0,08 e 0,16 mg L⁻¹), simbolizadas por BB16(-) e BB16(+), respectivamente.

O ensaio consistiu da avaliação dos efeitos dos tratamentos controle (sem a aplicação de compostos exógenos), da aplicação de BB16(-), BB16(+), glyphosate (G), imazapyr (I), além da interação hormônio-herbicida. A aplicação destes compostos foi realizada em um intervalo de 12 horas entre elas, o que configura a aplicação de glyphosate ou imazapyr 12 horas após a de BB16 (em ambas concentrações), e vice-versa.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 13 tratamentos e quatro repetições, e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS, 1999).

A formulação do BIOBRAS-16 foi preparada pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de La Habana, contendo, como ingrediente ativo, um análogo espiroestano poli-hidroxilado de fórmula C₂₇H₄₂O₅ (Coll et al., 1995).

O monitoramento da fluorescência foi realizado às 16 horas à temperatura ambiente, tomando-se medida da terceira folha totalmente expandida (da parte apical para base da muda). Esta folha foi pré-adaptada ao escuro, com a utilização de pinças, por 30 minutos antes das determinações de fluorescência, uma vez que este tempo é suficiente para a “estabilização” do sistema transportador de elétrons do processo fotossintético, admitindo-se que todos os centros de reação tenham adquirido a condição de abertos (Q_a oxidada) (Bøhler-Nordenkamph et al., 1989). Após este período, a iluminação foi fornecida por meio de um conjunto de 6 LEDs com comprimento de onda de 650 nm na superfície da amostra para fornecer energia luminosa homogênea de 3.000 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em 100% da intensidade luminosa, sob uma área de 4 mm de diâmetro. Por meio de

um fluorômetro de luz não-modulada modelo PEA (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Norfolk, UK) foi possível obter as variáveis F_o (fluorescência inicial), F_m (fluorescência máxima) e a relação F_v/F_m (eficiência fotoquímica do PS II).

Utilizando o programa computacional Biolyzer (R.J. Strasser, University of Geneva, Laboratory of Bioenergetics, Switzerland), foram obtidos alguns indicadores do desempenho do processo fotossintético, como ABS/RC (referente à quantidade de energia absorvida pelos pigmentos no complexo-antena do PS II, por unidade de centro de reação ativo) e DI_o/RC (energia dissipada por unidade de centro de reação ativo) (Strasser e Strasser, 1995; Strasser et al., 2000).

Semanalmente, foram aferidos o diâmetro (tomado a 2,5 cm do colo da muda) e a altura (esta relativa à distância entre o colo e a inserção da folha mais nova no ápice da muda), utilizando-se um paquímetro digital e régua graduada, respectivamente; além de avaliações visuais de intoxicação documentadas através de fotografias. Ao final do ensaio (12 dias após a aplicação dos tratamentos – DAT), após a secção do caule à altura da inserção das raízes, as mudas foram coletadas, acondicionadas separadamente em sacos de papel e colocadas em estufa com circulação de ar, a 72 ± 1 °C, por aproximadamente 72 horas, para determinação das biomassas secas de parte aérea e do sistema radicular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos controle, BB16(-) e BB16(+) promoveram maior incremento na biomassa seca da parte aérea, sendo significativamente maior ao apresentado pelos demais tratamentos. No entanto, quanto ao ganho de biomassa pelo sistema radicular e, com relação as variáveis biométricas, o mesmo não foi verificado, dado à não-significância entre a biomassa seca das raízes para os tratamentos avaliados, bem como altura e diâmetro das mudas (Figura 1), provavelmente devido ao curto intervalo de tempo para análise final do experimento.

Todavia, mesmo não apresentando diferenças de intoxicação mediante a análise de variáveis biométricas, pôde ser verificado discrepâncias entre os tratamentos, ao se analisar os parâmetros da fluorescência (Figuras 2 e 3). O uso de vários destes parâmetros, advindos da curva de Kautsky – ou curva de

indução de fluorescência – é prática comum em pesquisas com estresses em plantas (Habash et al., 1985; Govindjee, 1995; Lazár et al., 1997; Misra et al., 2001).

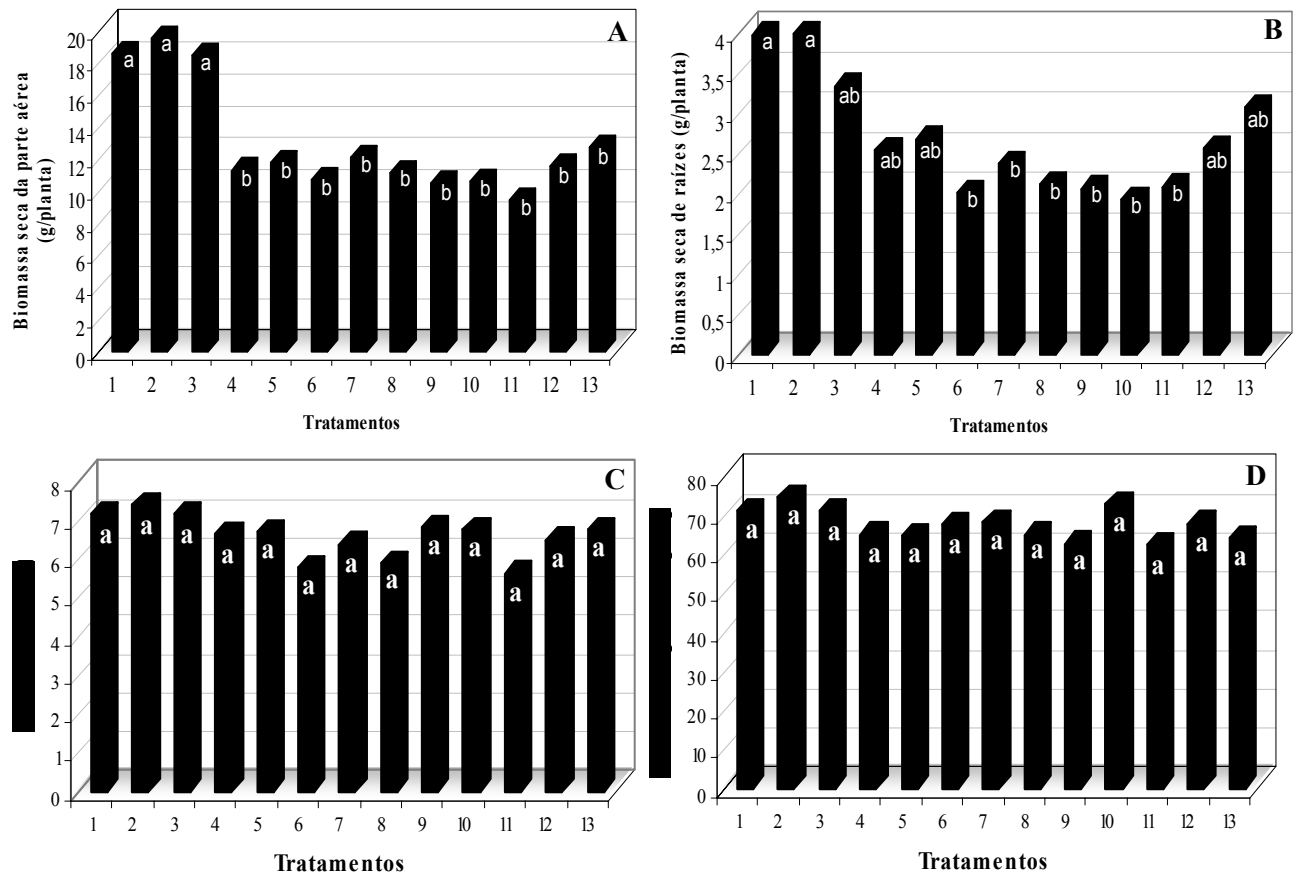


Figura 1 – Biomassa seca da parte aérea (A) e do sistema radicular (B), diâmetro (C) e altura (D) de mudas de *Eucalyptus grandis* aos 12 DAT em função dos tratamentos: 1-testemunha; 2-BB16(-); 3-BB16(+); 4-glyphosate; 5-imazapyr; 6-BB16(-)+G; 7-BB16(-)+I; 8-BB16(+)+G; 9-BB16(+)+I; 10-G+ BB16(-); 11-G+ BB16(+); 12-I+ BB16(-) e 13-I+ BB16 (+).

Médias seguidas de letras iguais, dentro de cada parâmetro analisado, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Em função da similaridade dos comportamentos apresentados pelas concentrações de BB16, optou-se por demonstrar, graficamente, os dados, utilizando somente a maior concentração deste ($0,16 \text{ mg L}^{-1}$), simbolizada por BB16(+). Desta forma, todos os tratamentos que receberam a aplicação prévia, ou posterior, deste análogo de brassinosteróide, foram representados apenas pela interação com a concentração de $0,16 \text{ mg L}^{-1}$.

Independentemente do parâmetro avaliado, a partir do quarto dia, em virtude da desidratação total da folha-medida, não foi possível fazer mensurações do aparato fotossintético no tratamento que recebeu a aplicação de glyphosate e,

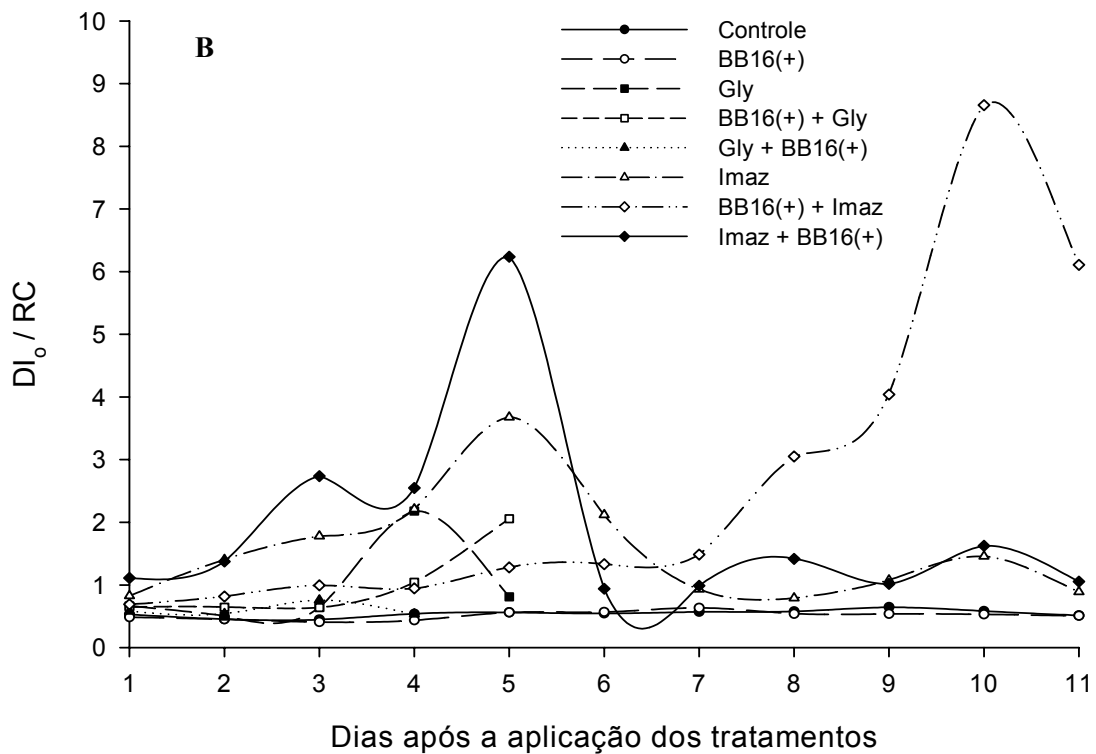
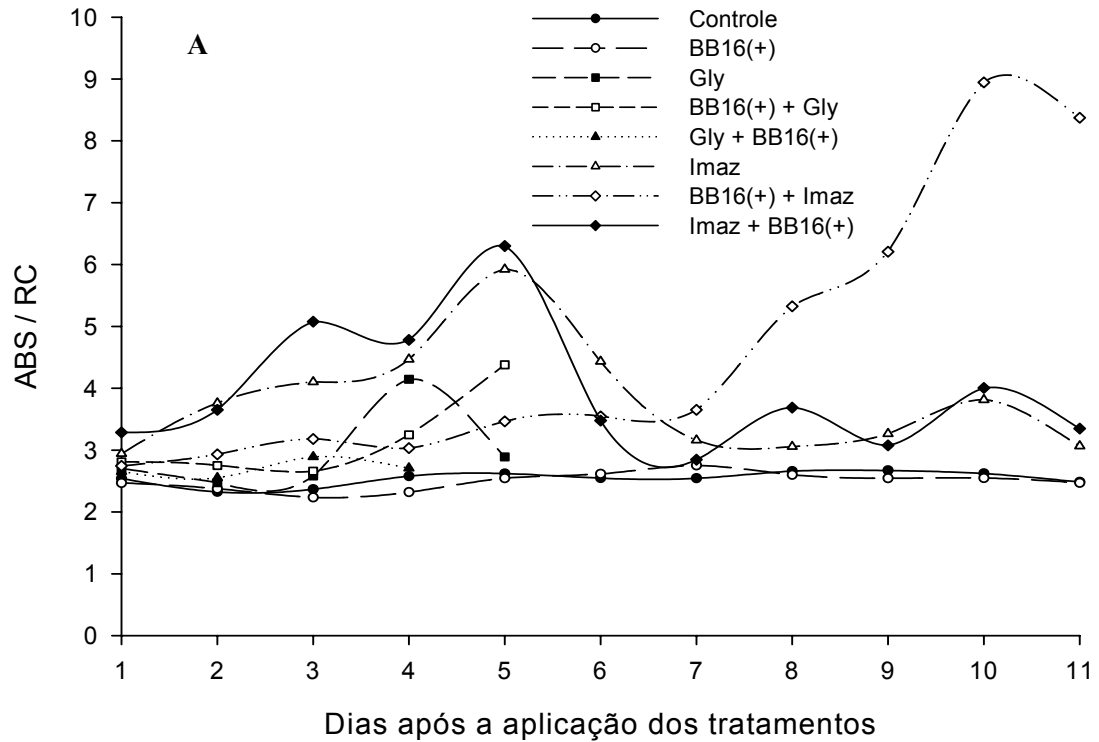


Figura 2 – Valores médios dos parâmetros fotossintéticos mensurados às 16 h ao longo do período experimental em mudas de *Eucalyptus grandis*. A - ABS/RC (energia absorvida por unidade de centro de reação ativo) e B - DI_0/RC (energia dissipada por centro de reação ativo).

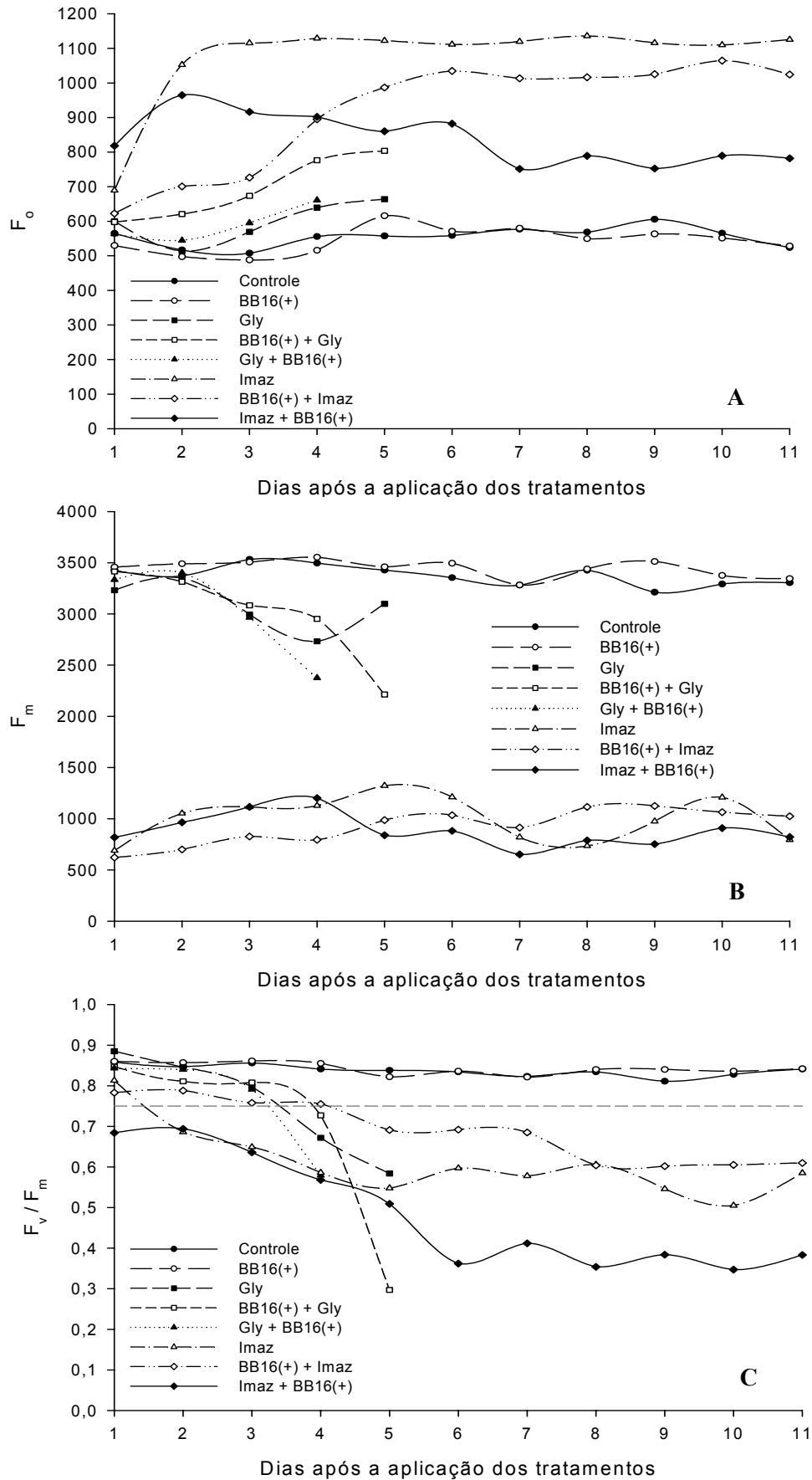


Figura 3 – Valores médios dos parâmetros fotossintéticos mensurados às 16 h ao longo do período experimental em mudas de *Eucalyptus grandis*. A - F_0 (fluorescência inicial), B - F_m (fluorescência máxima) e C - F_v/F_m (eficiência quântica do fotossistema II).

12 horas após, a de BB16; o mesmo ocorreu ao quinto dia, quando se aplicou somente glyphosate ou quando este foi utilizado após a aplicação de BB16.

O tratamento que recebeu a aplicação de BB16 após a de imazapyr causou significativo efeito deletério ao aparato fotossintético da muda, dado que, ao final do período experimental, pôde-se verificar que o valor da razão ABS/RC foi maior para este tratamento (Figura 2A). Em virtude de este tratamento ter resultado em alta destruição dos centros de reação ativos (RC), menor quantidade destes centros estavam disponíveis para absorção da energia luminosa. Sendo RC o denominador da razão ABS/RC, verificou-se que os altos valores apresentados pela mesma se devem aos menores valores do divisor da razão. Idêntico comportamento constatou-se com relação à energia dissipada por centro de reação ativo (DI_o/RC) (Figura 2B).

O valor da fluorescência inicial (F_o) pode ser elevado, caso os centros de reação do PS II estejam comprometidos ou, se a transferência da energia de excitação do complexo-antena para os centros de reação esteja prejudicada (Bolhàr-Nordenkamph et al., 1989). Para o tratamento Imazapyr + BB16(+) verificou-se que os elevados valores de F_o (Figura 3A) representaram alto nível de fluorescência emanada quando a quinona a (Q_a) estava no seu estado de máxima oxidação, portanto, quando os centros de reação do PS II estavam totalmente abertos (Baker e Rosenqvist, 2004). Nesta situação, quanto maior for o valor de F_o , maior será a tentativa dos fotossistemas em dissipar, na forma de fluorescência, o excesso de energia não aproveitado.

Neste caso, devido à interferência dos tratamentos imazapyr (I), I + BB16(-) e I + BB16(+) no aparato fotossintético, menor quantidade de energia estava sendo utilizada para reduzir a Q_a , haja vista os baixos valores de F_m apresentados (Figura 3B), sendo estes referentes ao nível de fluorescência quando a Q_a está totalmente reduzida, isto é, quando os centros de reação do PS II estão fechados (Baker e Rosenqvist, 2004).

Ao se comparar as curvas de fluorescência máxima, percebe-se que os tratamentos controle e BB16(+) apresentaram maiores valores, ao passo que os tratamentos que receberam a aplicação de imazapyr (com ou sem o análogo de brassinosteróide) apresentaram os menores valores para este parâmetro, sendo que, os que receberam a aplicação de glyphosate não persistiram até a última avaliação, dado a morte das mudas nos primeiros dias de avaliação (Figura 3B).

Elevados valores de F_v/F_m (0,75 a 0,85) refletem adequada taxa de conversão de energia luminosa em fluxo de elétrons no fotossistema II. Nestes casos, necessita-se de eficiente estruturação do PS II, a qual é obtida mediante quantidade considerável de moléculas de clorofilas não-degradadas e ordenação dos polipeptídeos que compõem este fotossistema (Bøhler-Nordenkamph et al., 1989). Pôde-se verificar, no entanto, que, a partir do quarto DAT, o aparato fotossintético das mudas que receberam a aplicação dos herbicidas (precedidos ou não da aplicação de BB16), sofreu drástica interferência, dado os valores de F_v/F_m inferiores a 0,75 (Figura 3C). Todavia, a partir do quinto DAT, somente os tratamentos controle e BB16(+) demonstraram razão maior que 0,7; enquanto que para os tratamentos que receberam glyphosate (antes ou após este análogo hormonal) não foi possível obter os valores de F_v/F_m (Figura 3C), em função da necrose da folha-medida.

Nos tratamentos compostos pela aplicação dos herbicidas, obtiveram-se médias de rendimento quântico máximo do PS II inferiores aos das mudas-controle e aos das que receberam aplicação somente de BB16, sendo que nestas últimas, o valor da relação F_v/F_m foi superior a 0,80 ao longo do ensaio (Figura 3C), sugerindo que os herbicidas tenham provocado redução no fluxo de elétrons entre os fotossistemas, com conseqüente redução na quantidade de energia aproveitada pela planta para a realização dos processos fotoquímicos, como fixação de CO_2 e redução de NADPH.

Verificou-se que não houve interação das aplicações do herbicida glyphosate com BB16, sendo este aplicado previamente ou não; no entanto, quando se aplicou imazapyr, constatou-se interação com o análogo hormonal, uma vez que, ao término do período experimental, as mudas submetidas à interação imazapyr-BB16 apresentaram sintomas visuais díspares das que receberam glyphosate, sendo que neste último caso, ocorreu necrose total das mesmas (Figura 4). Supõe-se que a interação BB16 e imazapyr esteja relacionada ao aminoácido leucina, dado que para a ligação deste hormônio à célula faz-se necessária a presença do receptor BRI1, sendo este associado à membrana plasmática, constituído de uma terminação N (extracelular) rica deste aminoácido (Li e Chory, 1997; Friedrichsen et al., 2000; Bishop e Yokota, 2001). O menor conteúdo de leucina em mudas tratadas com imazapyr reduziria o número de receptores de BB16, conseqüentemente, menor quantidade deste

hormônio ligar-se-ia às células, desencadeando o processo de proteção à ação do herbicida.

Com a aplicação de glyphosate, tem-se a inibição da enzima EPSPs (3-enoilpiruvilxiquimato-5-fosfato sintase), a qual participa da síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (Sikorski e Gruys, 1997) (sendo que estes não são requeridos primordialmente para síntese dos receptores de BR), daí a não interação glyphosate-BB16, portanto, aplicar este herbicida antes ou após o hormônio não confere efeito protetor por BB16.

A emissão da fluorescência da clorofila é um indicador do desempenho fotossintético da planta, sendo assim, os parâmetros da fluorescência têm sido utilizados para relatar a taxa de assimilação fotossintética de CO₂ pelas folhas (Siebke et al., 1997) e no estudo do aparato fotossintético (Maxwell e Johnson, 2000). Conseqüentemente, alterações no metabolismo fotossintético implicam em modificações na cinética de emissão de fluorescência característica da planta.

Há evidências de que muitos inibidores de processos metabólicos, que não estão diretamente ligados ao processo fotossintético, podem causar modificações na cinética da fluorescência (Christensen et al., 2003). Os herbicidas, de forma geral, podem atuar desta maneira (Barbagallo et al., 2003). O glyphosate, por exemplo, interrompe a síntese de aminoácidos aromáticos por bloquear a rota do ácido xiquímico, induzindo a significativas alterações na emissão de fluorescência (Ireland et al., 1986), associado a modificações no metabolismo do carbono fotossintético (Madsen et al., 1995).

Desta forma, a inibição de reações metabólicas não envolvidas diretamente na fotossíntese pode modificar a síntese de intermediários utilizados no processo fotossintético e, assim, interferir na fotossíntese e na emissão de fluorescência (Baker e Rosenqvist, 2004). O que pôde ser verificado no caso da aplicação dos inibidores de aminoácidos imazapyr e glyphosate.

CONCLUSÕES

Com relação as variáveis biométricas, não foi verificada interferência dos herbicidas, se comparado aos controles. Contudo, imazapyr e glyphosate

causaram efeitos deletérios indiretos no processo fotossintético, mesmo antes da verificação dos sintomas visuais de toxidez.

Quando os herbicidas foram associados à aplicação do análogo de brassinosteróide (BB16), os efeitos de intoxicação foram menos expressivos sob a utilização de imazapyr.

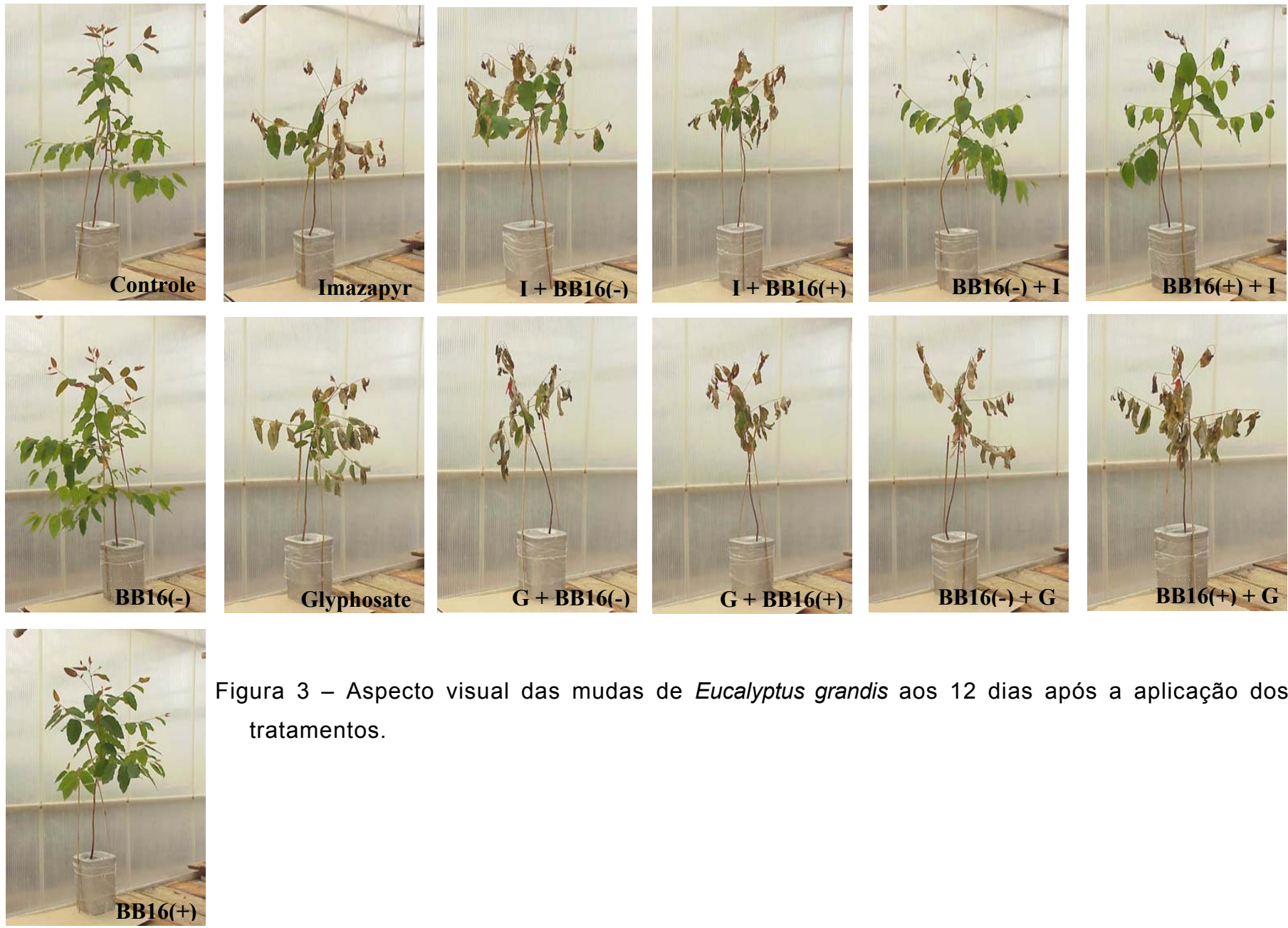


Figura 3 – Aspecto visual das mudas de *Eucalyptus grandis* aos 12 dias após a aplicação dos tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araus, J.L., Hogan, K.P. (1994) Comparative leaf structure and patterns of photoinhibition of the neotropical palms. *Scheelea zonensis* and *Socratea durissima* growing in clearing and forest understory during the dry season in Panama. *Am. J. Bot.* 81 (6):726-738.
- Baker, N.R., Rosenqvist, (2004) E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55 (403):1607-1621.
- Barbagallo, R.P., Oxborough, K., Pallet, K.E., Baker, N.R. (2003) Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* 132 (2): 485-496.
- Belkhodja, R., Morales, F., Abadia, A., Comez-Aparisi, J., Abadia, J. (1994) Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 104 (2):667-673.
- Bishop, G.J., Yokota, T. (2001) Plant steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant Cell Physiol.* 42 (2):114-120.
- Bolhàr-Nordenkamph, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct. Ecol.* 3 (4):497-514.
- Bown, A.W., Hall, D.E., Macgregor, K.B. (2002) Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. *Plant Physiol.* 129 (4):1430-1434.
- Castro, F.A. (2005) *Relações do valor do medidor portátil de clorofila (SPAD-502) com o processo fotossintético e com o teor de nitrogênio orgânico em dois genótipos de Carica papaya L.* Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 53f.
- Catunda, M.G., Freitas, S.P., Oliveira, J.G., Silva, C.M.M. (2005) Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). *Planta Daninha*, 23 (1):115-121.

- Christensen, M.G., Teicher, H.B., Streibig, J.C. (2003) Linking fluorescence induction curve and biomass in herbicide screening. *Pest Manag. Sci.* 59 (12): 1303-1310.
- Clark, R.B. (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.* 23 (3):458-460.
- Coll, M.F., Jomarrón, R.I.M., Robaina, R.C.M., Alonso, B.E.M., Cabrera, P.M.T. (1995). Polyhydroxyspirostanones as plant growth regulators. PCT Int. Appl. CO 7J 71/100, AOIN 45/00 WO 97/13780.
- Friedrichsen, D.M., Joazeiro, C.A., Li, J., Hunter, T., Chory, J. (2000) Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* 123 (4):1247-1256.
- Govindjee (1995) 63 Years since Kautsky - Chlorophyll-A fluorescence. *Austral. J. Plant Physiol.* 22 (1):131-160.
- Habash, D., Percival, M.P., Baker, N.R. (1985) Rapid chlorophyll fluorescence technique for the study of penetration of photosynthetically active herbicides into leaf tissue. *Weed Res.* 25 (5): 389-395.
- Ireland, C.R., Percival, M.P., Baker, N.R. (1986) Modification of the induction of photosynthesis in wheat by glyphosate, an inhibitor of amino acid metabolism. *J. Exp. Bot.* 37 (176):299-308.
- Krause, G.H., Winter, K. (1996) Photoinhibition of photosynthesis in plants growing in natural tropical forest gaps: a chlorophyll fluorescence study. *Bot. Acta*, 109 (6):456-462.
- Lazár, D., Nauš, J., Matoušková, M., Flašsarová, M. (1997) Mathematical modeling of changes in chlorophyll fluorescence induction caused by herbicides. *Pestic Biochem Physiol.* 57 (3): 200-210.
- Li, J., Chory, J. (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 90 (5):929-938.
- Madsen, K.H., Heitholt, J.J., Duke, S.O., Smeda, R.J., Streibig, J.C. (1995) Photosynthetic parameters in glyphosate-treated sugar-beet (*Beta vulgaris* L.). *Weed Res.* 32 (1): 81-88.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51 (345):659-668.
- Mazza, C.A., Boccalandro, H.E., Giordano, C.V., Battista, D., Scopel, A.L., Ballaré, C.L. (2000) Functional significance and induction by solar radiation of

- ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiol.* 122 (1): 117-126.
- Misra, A.N., Srivastava, A., Strasser, R.J. (2001) Utilization of fast chlorophyll A fluorescence technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and *Brassica* seedlings. *J. Plant Physiol.* 158 (9):1173-1181.
- Oliveira, J.G., Alves, P.L.C.A., Magalhães, A.C. (2002) The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. The protective action of chloroplastid pigments. *Braz. J. Plant Physiol.* 14 (2):95-104.
- Peterson, R.B., Aylor, D.E. (1995) Chlorophyll fluorescence induction in leaves of *Phaseolus vulgaris* infected with bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Plant Physiol.* 108 (1):163-171.
- Rascher, U., Liebig, M., Lüttge, U. (2000) Evaluation of instant light-responses curves of chlorophyll parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant Cell Environ.* 23 (12):1397-1405.
- Roden, J.S., Ball, M.C. (1996) The effect of elevated [CO₂] on growth and photosynthesis of two eucalyptus species exposed to high temperatures and water deficits. *Plant Physiol.* 111(3):909-919.
- SAS (1999) SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Version Eight.
- Schreiber, U., Kuhl, M., Klimant, I., Reising, H. (1996) Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM fluorometer with a fiber-optic microprobe. *Photosynth. Res.* 47 (1):103-109.
- Siebke, K., von Caemmerer, S., Badger, M., Furbank, R.T. (1997) Expressing an RbcS antisense gene in transgenic *Flaveria bidentis* leads to an increased quantum requirement for CO₂ fixed in photosystems I and II. *Plant Physiol.* 115 (3):1163-1174.
- Sikorski, J.A., Gruys, K.J. (1997) Understanding glyphosate's molecular mode of action with EPSP synthase: evidence favoring an allosteric inhibitor model. *Acc. Chem. Res.* 30 (1):2-8.
- Strasser, B.J., Strasser, R.J. (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-Test. In: Mathis, P. (ed.). Photosynthesis from light to biosphere. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, vol. V, p. 977-980.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M.,

Pather, U., Mohanly, P. (eds.). Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation. Taylor and Francis, London, pp. 445-483.

Young, A.L., Frank, H.A. (1996) Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 36 (1):3-15.

4. RESUMOS E CONCLUSÕES

Foram realizados três experimentos em casa de vegetação, com os objetivos de avaliar os efeitos da exsudação radicular de imazapyr por *Eucalyptus grandis*, identificar alterações celulares em função da presença deste e verificar a possível interação entre os herbicidas utilizados no controle de brotações em eucaliptais com o análogo de brassinosteróide.

As mudas-controle e as que receberam a aplicação de imazapyr (1,500 kg ha⁻¹), 15 dias após a utilização deste, foram retiradas da solução e, em seus respectivos lugares, foi transplantada uma muda do mesmo clone (por vaso) constituindo-se o bioindicador (BIO) dos efeitos da exsudação radicular. Foram coletadas amostras de gemas apicais de ramos, para análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão, 72 horas após o transplante dos BIOS, além da avaliação dos efeitos da exsudação sobre o crescimento destes, realizada aos 60 dias após o transplante.

Os exsudados radiculares das mudas submetidas à aplicação de imazapyr causaram alterações significativas nas variáveis biométricas estudadas, sendo que os BIOS apresentaram citólise em função da ação de exsudados radiculares, contendo, possivelmente, imazapyr e, ou, produtos do processo de metabolização deste pelas mudas de eucalipto mudanças ultraestruturais nas células, tais como: aumento do número de células mesofílicas deformadas, cloroplastos com pequena quantidade de tilacóides, distorção de cristas da matriz

mitocondrial, vacuolização do citoplasma e rompimento de parede celular devido a alterações no sistema de endomembranas.

Para a avaliação da interação do análogo de brassinosteróide (BB16) com imazapyr, foram realizados dois ensaios, sendo que no primeiro utilizou-se somente o herbicida imazapyr aplicado imediatamente após BB16, e vice-versa. Já no segundo ensaio, foi utilizado este mesmo herbicida, além de glyphosate, ambos aplicados no intervalo de 12 horas após a aplicação de BB16, e vice-versa.

Sob estas condições, foi verificado que a aplicação de BB16, imediatamente após a de imazapyr, conferiu tolerância às mudas aos efeitos tóxicos do herbicida; no entanto, não proporcionando proteção quando aplicado 12 horas antes de BB16. Além disso, foi verificado que os herbicidas causaram efeitos deletérios ao aparato fotossintético das mudas de eucalipto, sendo que a aplicação de glyphosate resultou em menor tempo para expressão dos sintomas de intoxicação.

Sugere-se a instalação de novos experimentos para elucidar se BRI1 (receptor de brassinosteróide) participa diretamente na sinalização de respostas ao estresse através de interações com herbicidas, principalmente os pertencentes aos grupos químicos inibidores da enzima acetolactato sintase. Além da necessidade de análises de síntese de proteínas e do conteúdo de aminoácidos, com o objetivo de compreender a rota de interação BB16-herbicidas.

APÉNDICE

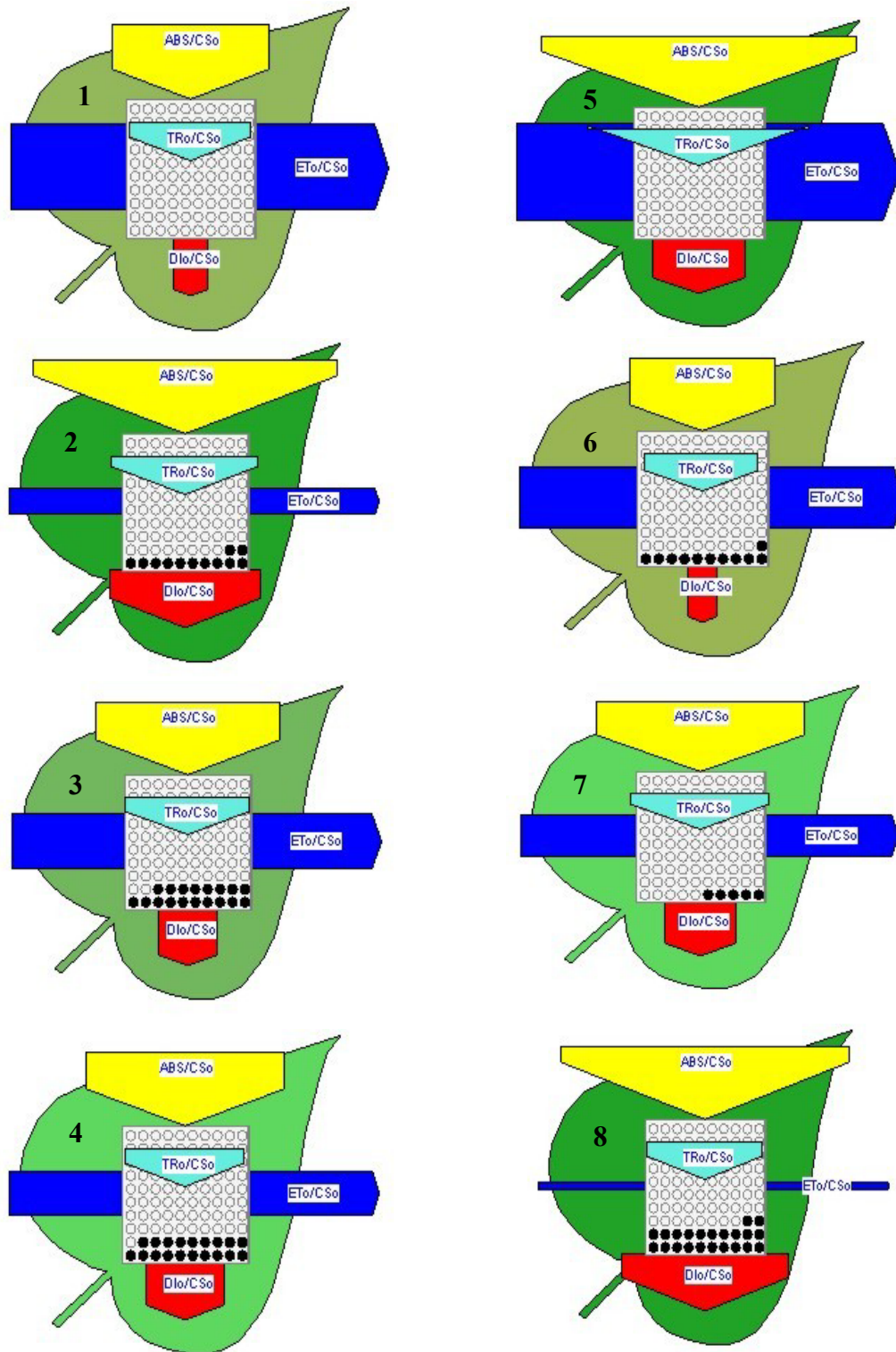


Figura 1A – Modelo “pipeline” de fluxo de energia da área foliar amostrada de mudas de eucalipto, para os tratamentos controle (1), glyphosate (2), BB16(+)+glyphosate (3), glyphosate+ BB16(+ (4), BB16(+ (5), imazapyr (6), BB16(+)+imazapyr (7), imazapyr+ BB16(+ (8), ao quarto dia após a aplicação dos tratamentos. ABS/CSo – energia absorvida por seção transversal; TRo/CSo – quantidade de energia capturada que reduziu a quinona *a*, por seção transversal; ETo/CSo – quantidade de energia utilizada no transporte de elétrons por seção transversal; Dlo/CSo – energia dissipada por seção transversal.