

**NATALIA DA CUNHA BEVILAQUA**

**TOLERÂNCIA DIFERENCIAL EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR  
AO CLOMAZONE E SUA RELAÇÃO COM O PERFIL MORFOLÓGICO,  
FOTOQUÍMICO E METABÓLICO**

**Botucatu**

**2023**



**NATALIA DA CUNHA BEVILAQUA**

**TOLERÂNCIA DIFERENCIAL EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR  
AO CLOMAZONE E SUA RELAÇÃO COM O PERFIL MORFOLÓGICO,  
FOTOQUÍMICO E METABÓLICO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas)

Orientador: Caio Antonio Carbonari

Coorientadora: Maria Lúcia Bueno Trindade

**Botucatu**

**2023**

B571t Bevilaqua, Natalia da Cunha  
Tolerância diferencial em variedades de cana-de-açúcar ao clomazone e sua relação com o perfil morfológico, fotoquímico e metabólico / Natalia da Cunha Bevilaqua. -- Botucatu, 2023  
91 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu  
Orientador: Caio Antonio Carbonari  
Coorientadora: Maria Lúcia Bueno Trindade

1. ketoclomazone. 2. inibidores da síntese de carotenoides. 3. metabolismo. 4. mudas-pré-brotadas.. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


TÍTULO DA TESE: TOLERÂNCIA DIFERENCIAL EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR AO CLOMAZONE E SUA RELAÇÃO COM O PERFIL MORFOLÓGICO, FOTOQUÍMICO E METABÓLICO

**AUTORA: NATALIA DA CUNHA BEVILAQUA**

**ORIENTADOR: CAIO ANTONIO CARBONARI**

**COORIENTADORA: MARIA LÚCIA BUENO TRINDADE**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI (Participação Presencial)  
Protecao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu

  
Pesquisador Dr. TIAGO GAZOLA (Participação Virtual)  
. / CTC Tecnologia Canavieira

  
Pesquisadora Dr.<sup>a</sup> NATÁLIA CORNIANI (Participação Presencial)  
. / Centre for Agricultural Bioscience International

  
Prof. Dr. MARCELO DE ALMEIDA SILVA (Participação Presencial)  
Producao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu

  
Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI (Participação Presencial)  
Protecao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu

Botucatu, 23 de junho de 2023



*Aos meus amados pais, tia e avó  
Gizebel, Raimundo, Gizene e Odília*

*Dedico*



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por mais essa oportunidade, por sempre colocar boas pessoas em meu caminho e por me dar forças e determinação para vencer as adversidades.

Aos meus pais Raimundo e Gizebel, que são os maiores responsáveis por mais essa conquista, por todo amor, carinho e incentivo.

A toda minha família, em especial minha tia Gizene e minha avó Odília por todo amor e suporte.

Ao Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari pela orientação, ensinamentos e oportunidades durante esses anos, tendo papel fundamental em todos os aprendizados adquiridos e na condução desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini por todo suporte nessa pesquisa e por ser motivo de inspiração para que a busca por conhecimentos seja constante.

A minha Coorientadora Maria Lúcia Trindade pelas contribuições durante o desenvolvimento da pesquisa.

A Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA - UNESP Botucatu) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Proteção de plantas pela oportunidade e formação.

Aos professores do departamento de Proteção Vegetal por todo o conhecimento compartilhado durante as disciplinas cursadas.

Aos amigos e funcionários do laboratório NUPAM, José Roberto Marques Silva, José Guilherme Ferreira Cordeiro e Luis Marcelo Siono pela parceria e ajuda durante esses anos.

Aos amigos do NUPAM em especial Bruno Flaibam, Vinícius Pereira e Fábio Krenchinski que além dos momentos de descontração foram fundamentais em todas as etapas de condução dessa pesquisa; Ivana Ferraz, Ana Karollyna de Matos e Diego Munhoz Gomes pelo apoio e contribuições oferecidas durante este trabalho; Ivana Moishinho, Tamara Mundt, Laís Precipito e Jéssica Bonamichi pela colaboração e ótimos momentos de convivência.

Ao meu amigo Renato Costa, pela fundamental participação na instalação dos ensaios e análise dos dados, por sempre estar disposto a ajudar e por todos os momentos vividos durante todos esses anos de pós-graduação.

Ao meu amigo Felipe Barreto por toda ajuda durante a condução desta pesquisa, por estar sempre presente em minha vida nos momentos bons e apoiando nos momentos de dificuldade.

Ao meu gestor Fabricio Sebok pela oportunidade oferecida ao final deste período e por todo apoio e incentivo que foram de grande importância para o encerramento desta etapa.

Aos queridos amigos Bárbara Demattê, Fernando Bernardini, Gisele Silveira e Jéssica Faria pelo apoio, preocupação e por tornarem o final desse período um pouco mais leve.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Dentre os principais herbicidas registrados para a cultura da cana-de-açúcar destaca-se o clomazone. Cultivares de cana-de-açúcar apresentam comportamentos distintos quanto a tolerância a esse herbicida devido ao estágio de desenvolvimento da cultura aliado a época de aplicação e diferenças na absorção e metabolização que também podem estar envolvidas na tolerância diferencial das variedades. O objetivo do trabalho foi avaliar a tolerância diferencial de variedades de cana-de-açúcar ao herbicida clomazone e compreender sua relação com o perfil morfológico, fotoquímico e bioquímico das plantas. Quatro experimentos foram realizados com as variedades de cana-de-açúcar SP80-3280, RB97-5375, RB93-579 e RB97-5201 plantadas via mudas pré-brotadas (MPB), para os três primeiros experimentos a aplicação de clomazone foi realizada sete dias após o transplântio. O primeiro experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições em esquema fatorial 4 x 2 (variedades x doses), o clomazone foi aplicado nas doses de 0 e 1000 g i.a. ha<sup>-1</sup>. Avaliações de fitointoxicação, número de folhas e perfilhos, altura, taxa de transporte de elétrons (ETR) e eficiência fotoquímica efetiva do Fotossistema II (ΦPSII) foram realizadas aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação do herbicida (DAA). O segundo experimento foi realizado em esquema fatorial 4 x 8, ou seja, quatro variedades e oito doses do herbicida clomazone, (0; 250; 500; 1000; 2000; 4000; 8000 e 16000 g i.a. ha<sup>-1</sup>). Aos 28 dias após a aplicação foram realizadas avaliações de fitointoxicação, altura e massa seca das plantas. O terceiro experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições em esquema fatorial 4 x 4 (variedades x tempos de coleta). As plantas foram coletadas 1, 8, 24 e 72 horas após a aplicação do herbicida (HAA) para determinação dos teores de clomazone e dos metabólitos hydroxyclozoxone e ketoclozoxone. Para o quarto experimento utilizou-se o traçador corante Azul Brilhante nas mesmas variedades com a aplicação ocorrendo aos 7 e 30 dias após o transplântio das mudas (DAT) no intuito de verificar a deposição nas plantas. Observou-se diferença quanto à sensibilidade das variedades de cana-de-açúcar ao herbicida clomazone, as variedades SP80-3280, RB97-5375 foram mais tolerantes a ação do herbicida, já as variedades RB93-579 e RB97-5201 sofreram as maiores injúrias, sendo que RB93-579 foi mais sensível ao clomazone, apresentando a maior redução de massa seca da parte aérea. As variedades consideradas tolerantes

apresentaram comportamento de metabolização do clomazone distinto do observado para as variedades sensíveis, apresentando em pelo menos dois períodos de coleta menores concentrações do metabólito ketoclomazone. A tolerância diferencial das variedades pode ser explicada por diferenças encontradas no metabolismo do clomazone.

**Palavras-chave:** ketoclomazone; inibidores da síntese de carotenoides; metabolismo; mudas-pré-brotadas.

## ABSTRACT

Among the main herbicides registered for sugarcane cultivation, clomazone stands out. Sugarcane cultivars exhibit distinct behaviors regarding tolerance to this herbicide due to the crop's development stage, application timing, and differences in absorption and metabolism, which may also be involved in the differential tolerance of the varieties. The objective of this study was to evaluate the differential tolerance of sugarcane varieties to the herbicide clomazone and to understand its relationship with the plants' morphological, photochemical, and biochemical profiles. Four experiments were conducted with the sugarcane varieties SP80-3280, RB97-5375, RB93-579, and RB97-5201, planted via pre-sprouted seedlings. For the first three experiments, clomazone was applied seven days after transplanting. The first experiment was conducted in a completely randomized experimental design with 5 replicates in a 4 x 2 factorial scheme (varieties x doses), with clomazone applied at doses of 0 and 1000 g a.i. ha<sup>-1</sup>. Phytotoxicity, leaf and tiller numbers, height, electron transport rate (ETR), and effective photochemical efficiency of Photosystem II ( $\Phi$ PSII) were evaluated at 3, 7, 14, 21, and 28 days after herbicide application (DAA). The second experiment was conducted in a 4 x 8 factorial scheme, four varieties and eight doses of the herbicide clomazone (0; 250; 500; 1000; 2000; 4000; 8000, and 16000 g a.i. ha<sup>-1</sup>). At 28 days after application, phytotoxicity, height, and dry mass of the plants were evaluated. The third experiment was conducted in a completely randomized experimental design with 5 replicates in a 4 x 4 factorial scheme (varieties x collection times). Plants were collected 1, 8, 24, and 72 hours after herbicide application (HAA) to determine the levels of clomazone and the metabolites hydroxyclozoxime and ketoclozoxime. For the fourth experiment, the tracer dye Brilliant Blue was used in the same varieties, with the application occurring at 7 and 30 days after seedling transplanting (DAT) to verify deposition in the plants. Differences in sensitivity to the herbicide clomazone were observed among the sugarcane varieties, with SP80-3280 and RB97-5375 being more tolerant to the herbicide, while RB93-579 and RB97-5201 suffered the most injuries, with RB93-579 being the most sensitive to clomazone, showing the greatest reduction in aerial dry mass. The varieties considered tolerant showed a different clomazone metabolism behavior compared to the sensitive varieties, showing lower concentrations of the metabolite ketoclozoxime in at least two collection periods. The

differential tolerance of the varieties can be explained by differences in clomazone metabolism.

**Keywords:** ketoclomazone; inhibitors of carotenoid biosynthesis; metabolism; pre-sprouted seedlings.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos .....	40
Tabela 2 - Massa molecular e fragmentos dos compostos analisados .....	41
Tabela 3 - Análise de variância dos valores de fitointoxicação aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) de clomazone .....	47
Tabela 4 - Análise de variância dos valores de altura, número de folhas, número de perfilhos, taxa de transporte de elétrons, eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema II ( $\phi$ PSII) aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) de clomazone e da massa seca aos 28 DAA .....	50
Tabela 5 - Valores de quadrado médio (QMe), coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e constantes da equação de regressão para fitointoxicação, altura e massa seca das quatro variedades de cana-de-açúcar aos 28 dias após a aplicação (DAA) de diferentes doses de clomazone .....	59
Tabela 6 - Análise de variância das concentrações do traçador aplicado aos 30 e 7 dias após o transplântio (DAT) de quatro variedades de cana-de-açúcar	74
Tabela 7 - Estimativas dos parâmetros e dos valores de média, moda e mediana dos modelos de Gompertz ajustados para os dados de deposição do traçador e do clomazone aplicados aos 30 e 7 dias após o transplântio de quatro variedade de cana-de-açúcar .....	77



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Aplicação de clomazone em quatro variedades de cana-de-açúcar.....	35
Figura 2 - Temperatura mínima, média, máxima e precipitação durante a condução dos experimentos. 1ª repetição Experimentos 1 e 3 (A), 2ª repetição Experimentos 1 e 3 e Experimento 2 (B).....	36
Figura 3 - Procedimentos para determinação do teor interno dos compostos. Maceração (A), pesagem (B), adição da solução extratora (C), sonicação (D), centrifugação (E) e filtragem (F) das amostras.....	39
Figura 4 - Cromatógrafo líquido (Prominence UFLC) acoplado ao espectrômetro de massas (Triple Quad 4500, AB Sciex).....	40
Figura 5 - Cromatograma obtido para o herbicida clomazone (12,5 ng mL <sup>-1</sup> ) .....	41
Figura 6 - Cromatograma obtido para os metabólitos hydroxyclozoxime (A) e ketoclozoxime (B) (12,5 ng mL <sup>-1</sup> ) .....	42
Figura 7 - Aplicação do traçador em variedades de cana-de-açúcar aos 30 DAT (A) e 7 DAT (B) .....	43
Figura 8 – Coleta da parte aérea (A), pesagem (B), lavagem (C) e leitura no espectrofotômetro (D, E) .....	44
Figura 9 - Fitointoxicação (%) de quatro variedades de cana-de-açúcar aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de clomazone .....	48
Figura 10 - Altura de plantas (% em relação à testemunha) de quatro variedades de cana-de-açúcar (% em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de clomazone .....	51
Figura 11 - Número de folhas (A) e perfilhos (B) de quatro variedades de cana-de-açúcar (% em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de clomazone .....	53
Figura 12 - Taxa de transporte de elétrons - ETR (A) e eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema II - ΦPSII (B) em quatro variedades de cana-de-açúcar (% em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de clomazone .....	55
Figura 13 - Massa seca (% em relação à testemunha) de quatro variedades de cana-de-açúcar aos 28 dias após aplicação (DAA) de clomazone .....	57

Figura 14 - Porcentagem de fitointoxicação para quatro variedades de cana-de-açúcar submetidas a diferentes doses do herbicida clomazone aos 28 dias após aplicação (DAA) .....	61
Figura 15 - Altura de plantas (% em relação à testemunha) para quatro variedades de cana-de-açúcar submetidas a diferentes doses do herbicida clomazone aos 28 dias após aplicação (DAA) .....	63
Figura 16 - Massa seca (% em relação à testemunha) para quatro variedades de cana-de-açúcar submetidas a diferentes doses do herbicida clomazone aos 28 dias após aplicação (DAA) .....	64
Figura 17 - Teores externos, internos e totais dos compostos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca) para as quatro variedades de cana-de-açúcar, nos períodos de 1, 8, 24 e 72 horas após aplicação (HAA) de clomazone .....	66
Figura 18 - Teores internos do herbicida clomazone e dos metabólitos hydroxyclozoxime e ketoclozoxime ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca), agrupados por variedades de cana-de-açúcar, nos períodos de 1, 8, 24 e 72 horas após a aplicação (HAA) de clomazone .....	68
Figura 19 - Teores internos do herbicida clomazone e dos metabólitos hydroxyclozoxime e ketoclozoxime ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca), agrupados por compostos, para as quatro variedades de cana-de-açúcar nos períodos de 1, 8, 24 e 72 horas após a aplicação (HAA) de clomazone .....	71
Figura 20 - Deposição do traçador corante Azul Brilhante ( $\text{mg kg}^{-1}$ de massa fresca) aplicado aos 30 e 7 dias após o transplante (DAT) de quatro variedades de cana-de-açúcar .....	75
Figura 21 - Frequência acumulada de depósitos do traçador corante Azul Brilhante ( $\mu\text{L cm}^{-2}$ ) e do herbicida clomazone ( $\text{ng cm}^{-2}$ ) aplicados aos 30 e 7 dias após o transplante (DAT) de quatro variedades de cana-de-açúcar .....	78

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>A cultura da cana-de-açúcar .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Interferência e controle de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.1</b>	<b><i>Controle químico de plantas daninhas</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Seletividade de herbicidas .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>Absorção e metabolismo diferencial de herbicidas</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.2</b>	<b><i>Clomazone</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Experimento 1 - Fitointoxicação, taxa de transporte de elétrons e crescimento da cana-de-açúcar com aplicação de clomazone .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Experimento 2 - Curva de dose-resposta de clomazone em variedades de cana-de-açúcar .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Experimento 3 - Absorção e metabolização de clomazone em variedades de cana-de-açúcar .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4</b>	<b>Experimento 4 - Deposição da calda de pulverização em variedades de cana-de-açúcar .....</b>	<b>42</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise dos resultados .....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Experimento 1 - Fitointoxicação, taxa de transporte de elétrons e crescimento da cana-de-açúcar com aplicação de clomazone .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>Experimento 2 - Curva dose resposta de clomazone em variedades de cana-de-açúcar .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3</b>	<b>Experimento 3 - Absorção e metabolização de clomazone em variedades de cana-de-açúcar .....</b>	<b>65</b>
<b>4.4</b>	<b>Experimento 4 - Deposição da calda de pulverização em variedades de cana-de-açúcar .....</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE A - Análise da homogeneidade das variâncias residuais (F<sub>máximo</sub>) entre os experimentos realizados em</b>	

	duplicata para as variáveis altura, número de folhas, número de perfilhos, taxa de transporte de elétrons (ETR) e eficiência fotoquímica Fotossistema II ( $\phi$ PSII) aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) e massa seca aos 28 DAA do clomazone .....	88
<b>APÊNDICE B</b>	- Análise da homogeneidade das variâncias residuais (Fmáximo) entre os experimentos realizados em duplicata para a variável fitointoxicação aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) do clomazone .....	89
<b>APÊNDICE C</b>	- Análise da homogeneidade das variâncias residuais (Fmáximo) entre os experimentos realizados em duplicata para as concentrações de clomazone, keto-clomazone e hydroxi-clomazone às 1, 8, 24 e 72 horas após a aplicação (DAA) do clomazone .....	90
<b>APÊNDICE D</b>	- Análise da homogeneidade das variâncias residuais (Fmáximo) entre os experimentos realizados em duplicata para os teores externos, internos e totais às 1, 8, 24 e 72 horas após a aplicação (DAA) do clomazone .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como maior produtor mundial de cana-de-açúcar, na safra 22/23 o país produziu 610 milhões de toneladas em 8,2 milhões de hectares (Conab, 2022). Dentre os principais produtos originados, destacam-se o etanol, o açúcar e a geração de energia elétrica através da biomassa.

Dentre os fatores que afetam a produtividade do canavial e geram custos de produção destaca-se a presença de plantas daninhas. Dependendo do grau de infestação o controle de plantas daninhas pode representar até 30% dos custos de produção (Arevalo, 2002). As plantas daninhas podem interferir no processo produtivo da cana-de-açúcar através da competição pelos recursos disponíveis no meio, principalmente água, luz e nutrientes, como também pela produção de compostos químicos liberados no ambiente que são prejudiciais à cultura (Victória Filho; Christoffoleti, 2004). Além disso, as plantas daninhas assumem grande importância quando atuam como hospedeiras alternativas de pragas e doenças que afetam a cultura. Sendo assim, é de fundamental importância o manejo adequado de plantas daninhas para que se tenha lucratividade nesse segmento agrícola.

O manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar pode ser realizado através de medidas preventivas, que visam evitar a entrada e disseminação de propágulos de plantas daninhas na área; medidas culturais como manejo varietal, manejo da palha, rotação, sucessão e culturas intercalares; além do controle mecânico e químico. O método químico é o mais empregado em virtude do alto rendimento e baixo custo quando comparado com outros métodos, além do elevado número de produtos eficientes registrados para essa cultura. Atualmente, no Brasil, existem aproximadamente 50 ingredientes ativos registrados para o controle de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar (Agrofit, 2023).

Dentre os herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar destaca-se o clomazone, pertencente ao grupo químico das isoxazolidinonas, apresenta absorção predominante pelo meristema apical das plântulas, pelas raízes e pelo colo das plantas, com translocação apoplástica (via xilema) (Procópio; Silva; Vargas, 2008). Esse herbicida atua no processo da fotossíntese, inibindo uma enzima da rota de síntese dos carotenoides, protetora da clorofila. Como resultado de sua ação, as

folhas das plantas sensíveis tornam-se brancas devido a fotodegradação da clorofila, sendo sintoma característico desse grupo de herbicidas (Senseman, 2007).

Uma das principais questões envolvidas no sucesso do controle químico das plantas daninhas na produção agrícola, está relacionada à seletividade dos herbicidas, que é considerada como uma medida de resposta diferencial de diversas espécies de plantas a um determinado produto. A aplicação será mais segura a medida que houver maior diferenciação de tolerância entre a cultura e a planta daninha (Oliveira Júnior; Inoue, 2011). No entanto, a seletividade do herbicida em uma determinada cultura ocorre até uma determinada dose, a partir desse ponto pode haver prejuízo no desenvolvimento da cultura ou até morte das plantas (Azania; Azania, 2014).

Diversos trabalhos foram realizados avaliando a seletividade dos herbicidas mais comumente utilizados na cana-de-açúcar, bem como a tolerância diferencial das principais variedades de cana-de-açúcar, porém, são poucas as informações sobre a relação do processo de metabolização de herbicidas na tolerância de variedades de cana-de-açúcar a esses produtos, principalmente quando aplicados em pós-emergência no sistema de mudas pré-brotadas. Nesse contexto o objetivo desse trabalho foi avaliar a tolerância de diferentes variedades de cana-de-açúcar ao herbicida clomazone e compreender sua relação com o perfil morfológico, fotoquímico e metabólico nas plantas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum* que abrange várias espécies, porém, a cana atualmente cultivada no Brasil e no mundo é resultado da hibridação realizada por programas de melhoramento, sendo que as espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule* fazem parte da constituição genética (Figueiredo, 2010; Jadoski *et al.*, 2010; Scarpari; Beauclair, 2010). É uma planta perene e própria de climas tropicais e subtropicais, nativa do sudeste da Ásia com centro de origem exato incerto, sendo as ilhas do Arquipélago da Polinésia, Nova Guiné e Índia as regiões mais citadas como possíveis centro de origem (Figueiredo, 2010).

A cana-de-açúcar apresenta metabolismo fotossintético C4, sendo considerada altamente eficiente na conversão de energia radiante em energia química, sendo estes processos de bioconversão de energia efetivamente afetados por parâmetros ambientais como: intensidade e quantidade de luz, concentração de CO<sub>2</sub>, disponibilidade de água e nutrientes e temperatura (Rodrigues, 1995).

Na região centro-sul do Brasil o plantio da cana pode ser realizado durante todo o ano, devendo-se atentar a restrições relacionadas à disponibilidade hídrica e algumas características das variedades como maturação e ciclo fenológico. Os principais períodos de plantio ocorrem de setembro a dezembro quando a cana é denominada “cana de ano”, de janeiro a abril caracterizando o plantio da “cana de ano e meio” e de maio a agosto conhecida como “cana de inverno” devido a época seca que ocorre na região, necessitando irrigação uma vez que a disponibilidade de água no solo é baixa durante esse período (Barbosa, 2016).

Atualmente o Brasil se destaca como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido pela Índia, sendo o maior produtor de açúcar e álcool e o maior exportador mundial de açúcar (FAO). A cana-de-açúcar no Brasil ocupa uma área total de aproximadamente 8,3 milhões de hectares, sendo o estado de São Paulo o maior produtor. A estimativa de produção de cana-de-açúcar do país é de 598,34 milhões de toneladas na safra 2022/23, representando um aumento de 2,8% na região Centro-Sul e 9,5% na região Norte-Nordeste quando comparada a safra 2021/22, sendo que

apenas o estado de São Paulo alcançou uma produção de 308,14 milhões de toneladas (Conab, 2022).

O panorama para a agroindústria da cana-de-açúcar tem se mostrado favorável em função do preço do petróleo e da demanda da sociedade com relação à proteção ao meio ambiente (Figueiredo, 2010). O setor sucroenergético brasileiro passa por uma fase favorável devido às mudanças importantes na dinâmica desse setor, levando à redução na competitividade das unidades industriais, adequação de estratégias adotadas e expansão no cultivo da cana-de-açúcar (Margarido; Santos, 2016).

Os interesses na tecnologia brasileira, que giram em torno dos aspectos sociais, econômicos e ambientais do etanol, têm refletido no aumento da produção de cana-de-açúcar no país nos últimos anos, que requer investimentos em infraestrutura e expansão de área plantada (Sobrinho et al., 2019).

O desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar é um processo contínuo que ocorre no Brasil e em outros países produtores, e tem como principal objetivo o aumento da produtividade, resistência a pragas e doenças e maior adaptabilidade à diferentes tipos de solo, técnicas de manejo e variações climáticas (Figueiredo, 2010; Jadoski *et al.*, 2010). Segundo Margarido e Santos (2016), a escolha da variedade ainda é a base de todas as tecnologias de produção, o manejo varietal se torna uma estratégia para obter ganhos através da interação genótipo/ambiente.

O Programa Cana do Instituto Agrônomo – IAC desenvolveu uma tecnologia que visa o plantio de cana-de-açúcar no sistema de multiplicação de mudas pré-brotadas (MPB). Os principais objetivos desse sistema são aumentar os ganhos econômicos, a eficiência na implantação de viveiros e no replantio de áreas comerciais, bem como na renovação e expansão de áreas de cana-de-açúcar, além de proporcionar rápida produção de mudas e garantir alto padrão de fitossanidade e uniformidade de plantio (Landell *et al.*, 2012).

## **2.2 Interferência e controle de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**

Um dos principais problemas que ocorrem na cultura da cana-de-açúcar é a interferência imposta pela presença das plantas daninhas na lavoura. Apesar de ser altamente eficiente na utilização dos recursos disponíveis para o seu crescimento, a cana-de-açúcar é intensamente afetada nas fases iniciais de crescimento pela

presença das plantas daninhas (Victória Filho; Christoffoleti, 2004). Esse fato ocorre principalmente em função do lento crescimento inicial da cana levando à um maior período para fechamento do dossel, permitindo o acesso das plantas daninhas à luz, aumentando assim a competição atribuída à estas espécies (Galon *et al.*, 2011).

Competição e alelopatia são os mecanismos de interferência mais relevantes quando se trata dos efeitos diretos sobre as plantas cultivadas (Pitelli, 2014), sendo que a competição pode ser considerada o principal fator de interferência e a principal consequência é a redução na produtividade da cana-de-açúcar (Kuva; Salgado, 2014). Quando essas plantas não são controladas adequadamente podem causar perdas na produtividade da cultura em até 85% (Dinardo-Miranda; Vasconcelos; Landell, 2010).

O conhecimento da extensão do período em que a cultura e a comunidade infestante estão convivendo e disputando por recursos do meio é fundamental (Pitelli, 2014). Diversos autores estudaram os períodos de interferência de espécies de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar, no entanto, os estudos devem ser realizados com maior frequência e em diferentes condições, pois esse processo é influenciado por diversos fatores relacionados à comunidade infestante, à cultura e ao ambiente que ocorre a relação de interferência (Kuva; Salgado, 2014).

Kuva *et al.* (2003), ao determinarem os períodos de interferência na cultura da cana-de-açúcar em área onde as espécies *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum* prevaleciam, observaram que quando se considera uma tolerância de 10% de redução na produtividade, o período anterior à interferência (PAI) foi de 106 dias e o período total de prevenção à interferência (PTPI) foi de 86 dias. Já quando os níveis de tolerância são reduzidos para 2%, o PAI foi de 58 dias e o PTPI de 186 dias. Em relação à produtividade, foi observado uma redução de 40% quando não foi realizado o controle das plantas daninhas durante todo o ciclo da cana-de-açúcar.

Em uma área com predominância de *Panicum maximum*, *Acanthospermum hispidum* e *Alternanthera tenella*, o PAI para a cana-de-açúcar foi de 18 dias após a brotação e o PTPI de 137 dias, considerando perda máxima de 5% na produção de colmos da cana-soca. Quando não houve o controle da comunidade infestante, foi observada perda de 33,4% na produtividade da área (Meirelles; Alves; Nepomuceno, 2009).

As variáveis morfológicas da cana-de-açúcar também podem ser afetadas pela presença das plantas daninhas, Galon *et al.* (2011) observaram redução da área foliar,

do diâmetro e número de colmos, da altura e do número de folhas e do acúmulo de massa seca da parte aérea de variedades de cana-de-açúcar com o aumento da população de *Brachiaria brizantha*. Zera, Schiavetto e Azania (2016) também identificaram reduções na altura, número de perfilhos e acúmulo de massa seca de mudas pré-brotadas (MPB) em competição com *Panicum maximum*.

Fica evidente que as plantas daninhas interferem negativamente na produtividade da cana-de-açúcar; o conhecimento da intensidade de interferência causada por populações de plantas daninhas, dos períodos críticos e do potencial de redução de produtividade são fundamentais para o planejamento dos manejos a serem adotados (Galon *et al.*, 2011; Kuva *et al.*, 2000; Oliveira; Freitas, 2008).

Na cultura de cana-de-açúcar o manejo de plantas daninhas tem como principais ferramentas os métodos de controle cultural, mecânico e químico (Silva *et al.*, 2018). No controle cultural, a competitividade da cana-de-açúcar em relação às plantas daninhas deve ser favorecida, a utilização de variedades altamente competitivas, sanidade das mudas, adubação adequada e espaçamento de plantio são medidas que podem auxiliar nesse processo (Procópio *et al.*, 2016).

No manejo varietal, a seleção de variedades de cana-de-açúcar mais adequadas para cada região e sistema de manejo é complexa. É importante o conhecimento das características das variedades que podem influenciar diretamente a competição entre a cultura e as plantas daninhas, como por exemplo arquitetura foliar, perfilhamento, brotação das soqueiras, exigência em fertilidade do solo, resistência à pragas e doenças e suscetibilidade a herbicidas (Procópio; Silva; Vargas, 2008).

A rotação com o plantio de culturas de ciclo curto, geralmente leguminosas, no período de renovação do canavial é uma prática de controle cultural amplamente adotada, apresenta custo relativamente baixo e promove aumentos significativos na produtividade da cana em pelo menos dois cortes consecutivos. Além de proteger o solo contra a erosão e evitar a propagação de plantas daninhas (Ambrosano *et al.*, 2005).

O sistema de produção de cana crua traz diversas modificações que impactam na composição das espécies infestantes, como por exemplo a manutenção de uma camada de palha sobre o solo (Azania *et al.*, 2002). A palha de cana-de-açúcar cobrindo a superfície do solo pode interferir na dormência, germinação e mortalidade das sementes de plantas daninhas, podendo causar mudanças na composição da

comunidade infestante. Essas mudanças são muito específicas e dinâmicas, pois dependem da quantidade de palha e da espécie daninha, que pode ser favorecida ou não pela cobertura morta (Correia; Durigan, 2004). Segundo Ferreira *et al.* (2010a), a maior eficácia da cobertura morta no controle das plantas daninhas, está relacionada com a quantidade ( $t\ ha^{-1}$ ), densidade e uniformidade de distribuição de palha da cana-de-açúcar no solo. A presença da palha também pode alterar a dinâmica dos herbicidas aplicados na cultura da cana-de-açúcar, refletindo no período residual de controle e na eficiência desses produtos e, conseqüentemente, na composição das plantas daninhas presentes na área (Kuva; Salgado, 2014).

No sistema de produção atualmente adotado, o controle mecânico de plantas daninhas pode ocorrer principalmente na renovação do canavial e durante a operação quebra-lombo, que tem como objetivo o nivelamento da área para a colheita mecanizada, e terá maior eficácia se integrado ao controle químico (Kuva; Salgado, 2014).

### **2.2.1 Controle químico de plantas daninhas**

O controle químico de plantas daninhas é o mais utilizado nos canaviais, a aplicação dos herbicidas pode ser realizada em pré-emergência, pós-emergência (inicial ou tardia), na reforma do canavial para controle da soqueira e como maturador em subdoses (Procópio *et al.*, 2016).

O controle de plantas daninhas na cana-planta pode ser feito em diversos momentos, através da dessecação pré-plantio utilizando herbicidas de ação total como o glifosato, podendo também haver associação com herbicidas residuais para evitar ou minimizar a reinfestação; com o pré-plantio incorporado quando o herbicida é aplicado antes da operação de nivelamento do solo, tendo como vantagem a ampliação da janela de aplicação, evitando a ocorrência de plantas daninhas em estágio avançado de desenvolvimento e aplicações em pós plantio da cana-de-açúcar, que pode ser realizada entre o plantio e a operação de nivelamento do solo (quebra-lombo) e do quebra lombo até o sombreamento total das entrelinhas. A extensão de cada um desses períodos é fundamental para a definição dos herbicidas que serão aplicados (Kuva; Salgado, 2014).

Em relação à aplicação de herbicidas na cana-soca, grande parte da colheita é realizada em período de solo seco ou semi-seco, permitindo que herbicidas com diferentes características físico-químicas sejam implementados no manejo. Nesse período, a maior disponibilidade no solo ocorre para herbicidas que apresentam alta solubilidade, baixa adsorção aos coloides do solo, baixa volatilidade e baixos índices de fotodegradação. Produtos como isoxaflutole, imazapic, amicarbazone e clomazone apresentam essas características (Christoffoleti *et al.*, 2004).

Com o aumento de áreas de cana-de-açúcar produzidas no sistema de cana-crua, que promove o depósito de restos culturais sobre o solo, houve uma mudança na dinâmica dos herbicidas no ambiente, uma vez que a interação com a camada de palha pode provocar alterações no comportamento e eficácia de controle desses produtos (Carbonari *et al.*, 2010). Características físico-químicas dos herbicidas como solubilidade (S), pressão de vapor (P) e o coeficiente octanol água (Kow) interferem diretamente nesse processo (Silva; Monquero, 2013).

Quando o plantio da cana-de-açúcar é realizado com a tecnologia de mudas pré-brotadas, são poucas as informações de como os herbicidas se comportarão quando aplicados em área total antes ou logo após o plantio das mudas (Sabbag *et al.*, 2017), desta forma o controle das plantas daninhas nesse sistema de plantio torna-se um desafio, pois se faz necessário alterar as modalidades e posicionamento de aplicação dos herbicidas para garantir a seletividade sobre as mudas (Zera; Schiavetto; Azania, 2016).

### **2.3 Seletividade de herbicidas**

Um dos principais fatores relacionados ao sucesso dos herbicidas modernos é sua ação fitotóxica seletiva (Cobb; Reade, 2011). A seletividade de herbicidas é considerada como uma medida da resposta diferencial de diversas espécies de plantas a um determinado herbicida (Oliveira Júnior; Inoue, 2011).

Os herbicidas seletivos são amplamente utilizados no controle químico em cana-de-açúcar, sendo capazes de eliminar plantas daninhas que se encontram presentes na cultura, aplicados nas doses recomendadas, sem reduzir a produtividade e qualidade do canavial (Velini *et al.*, 2000).

Fatores determinantes na seletividade estão relacionados às características das plantas como a seletividade associada à retenção ou absorção diferencial, que envolve fatores como idade, cultivar, tamanho da semente ou estrutura de propagação vegetativa e seletividade relacionada à translocação e ao metabolismo diferencial; outros fatores estão relacionados às características dos herbicidas ou método de aplicação como formulação, dose, localização espacial ou temporal em relação à planta (Azania; Azania, 2014; Oliveira Júnior; Inoue, 2011).

Cobb e Reade (2011) consideram que, embora a seletividade do herbicida seja resultante de uma interação complexa de diversos fatores, o metabolismo diferencial pode ser considerado o principal mecanismo. De maneira geral, as plantas apresentam grandes diferenças em sua capacidade de metabolizar herbicidas, o que pode estar diretamente relacionado com a tolerância ou suscetibilidade.

Para a cultura da cana-de-açúcar a seletividade de herbicidas está relacionada principalmente às características físico-químicas e dose do herbicida, das condições edafoclimáticas e do estágio de desenvolvimento da cultura no momento da aplicação e da suscetibilidade dos genótipos (Galon *et al.*, 2010). Segundo Procópio, Silva e Vargas (2008), as variedades de cana-de-açúcar apresentam tolerância diferencial aos herbicidas, sendo importante conhecer o grau de tolerância à um determinado produto para evitar danos ao crescimento e produção da cultura.

O desenvolvimento de variedades tolerantes a herbicidas, que pode ser realizado através do melhoramento genético convencional aliado às técnicas bioquímicas e de biologia molecular, pode contribuir para a redução dos custos envolvidos na produção da cultura, bem como das perdas inerentes às injúrias provocadas pela ação de herbicidas (Ferreira *et al.*, 2010b).

### **2.3.1 Absorção e metabolismo diferencial de herbicidas**

Para que exerça sua ação, o herbicida deve ser absorvido pela planta e atingir seu local de ação, onde poderá se acumular em concentrações que provocarão uma resposta fitotóxica. Uma vez que a quantidade do produto que atinge o local alvo é crucial para a fitotoxicidade, qualquer fator que altere a concentração do herbicida contribuirá para a seletividade. Diversos fatores podem influenciar a concentração final do herbicida nos locais de ação, incluindo a absorção pela parte aérea ou raiz, a

translocação dos locais de absorção para os locais de ação ou a metabolização do herbicida em composto não tóxicos para as plantas (Cobb; Reade, 2011; Hess, 1985).

A absorção de herbicidas ocorre de forma diferenciada para cada espécie e as características anato-morfológicas e anato-fisiológicas determinam a quantidade do herbicida que será absorvida pelas plantas (Azania; Azania, 2014). A absorção foliar é um processo complexo, que depende das propriedades físico-químicas dos produtos, das condições ambientais e das características da superfície foliar das plantas, como forma e espessura das ceras epicuticulares, permeabilidade da cutícula e presença de pelos e tricomas (Wang; Liu, 2007).

Componentes morfológicos que também podem influenciar na seletividade estão relacionados com o arranjo foliar, podendo garantir que maior área da superfície da folha seja exposta para maior interceptação da pulverização; e também com a distribuição dos meristemas, que tendem a ser mais acessíveis à pulverização em espécies de folhas largas quando comparado à bainha protetora ou folhas que envolvem o meristema presentes nas espécies monocotiledôneas (Cobb; Reade, 2011).

Zangouejad, Alebrahim e Tseng (2021), observaram que cultivares de tomate previamente identificadas como tolerantes ao dicamba, apresentaram absorção reduzida do herbicida quando comparado a cultivares sensíveis. A absorção diferencial foi atribuída às características foliares das cultivares, uma vez que as cultivares tolerantes apresentaram folhas mais estreitas e maior densidade de tricomas. Os autores sugerem que os cultivares sensíveis, por apresentarem maior área foliar, puderam interceptar uma quantidade mais significativa do dicamba, permitindo assim maior absorção do herbicida no tempo.

Abit e Al-Khatib (2009), avaliando a absorção de mesotrione em híbridos de sorgo observaram baixa taxa de absorção quando comparado aos teores relatados na cultura do milho. A baixa absorção foliar de mesotrione no sorgo pode ser devido à presença de maior quantidade de cera foliar e grande número de tricomas presentes nessa espécie. O híbrido de sorgo tolerante ao mesotrione apresentou absorção levemente maior do que o híbrido suscetível, os autores correlacionam este fato à possibilidade de haver menor dano nos tecidos, que continuaram absorvendo o herbicida ao longo do tempo. De maneira geral, as espécies tolerantes têm a capacidade de metabolizar o herbicida mais rápida e extensivamente do que as espécies suscetíveis.

O metabolismo dos herbicidas é um processo que pode envolver três fases: Fase I - conversão, Fase II - conjugação e Fase III – compartimentalização. Durante a fase I ocorrem reações de oxidação e hidroxilação, que normalmente aumentam a polaridade, produzindo uma substância mais solúvel em água e geralmente menos tóxica que o composto original. Modificações do herbicida na Fase I também podem fornecer sítios de ligação para conjugação (Fase II) (Hatzios, 1991).

O complexo enzimático citocromo P450 monooxigenase desempenha um papel primário no metabolismo da Fase I de herbicidas (Siminszky, 2006), as enzimas desse complexo estão envolvidas em uma ampla gama de reações de monooxigenação e hidroxilação, normalmente inserem um átomo de oxigênio em moléculas hidrofóbicas inertes para torná-las mais reativas e hidrossolúveis (Dimaano; Iwakami, 2021). Esse complexo forma a maior classe de enzimas vegetais, diversas proteínas P450 são provavelmente codificadas pela maioria das espécies de plantas (Werck-Reichhart; Hehn; Didierjean, 2000).

De acordo com Siminszky (2006), o metabolismo de vários herbicidas está relacionado com a ação do citocromo P450, diversos estudos demonstram mudanças na atividade herbicida e/ou na taxa de metabolismo do herbicida em resposta a inibidores de P450. Em levantamento de estudos realizado pelo autor, o envolvimento de P450s foi evidenciado no metabolismo de bentazona em soja; pirazossulfurometílico em arroz; fenoxaprope-etílico em cevada e clomazone em algodão.

A Fase II da metabolização envolve a conjugação de um pesticida ou metabólito de pesticida a metabólitos naturais das células, como aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos ou glutathione (Cobb; Reade, 2011), o que aumenta a solubilidade em água e reduz a toxicidade em comparação com o pesticida original, promovendo o reconhecimento pelos transportadores da fase III (Bartholomew *et al.*, 2002; Hatzios, 1991).

A reação de conjugação mais estudada em relação à desintoxicação de herbicidas é a de conjugação da glutathione, realizada pela família de enzimas glutathione S-transferases (GSTs). A glutathione pode ser encontrada em altas concentrações na maioria dos tecidos vegetais (Cobb; Reade, 2011). A conjugação de herbicidas com a glutathione também pode estar envolvida no transporte das moléculas para sequestro no vacúolo, longe de seu local de ação. Além disso, alguns GSTs podem desempenhar um papel geral na proteção de plantas contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (Reade; Milner; Cobb, 2004).

Assim como acontece com os P450s, a diversidade e a evolução dinâmica da família de genes GST permitem que eles desintoxiquem uma ampla gama de produtos químicos e estejam envolvidos na síntese de diversos metabólitos secundários (Yuan; Tranel; Stewart, 2007), desempenhando papel importante na tolerância das culturas a herbicidas. As enzimas GSTs estão envolvidas no metabolismo da Fase II de diversos herbicidas, como atrazina, alacloro e metolacloro (Reade; Milner; Cobb, 2004).

A Fase III pode envolver a conjugação secundária seguida pelo transporte dos conjugados para fora do citosol, nos compartimentos intracelulares e/ou espaço extracelular, como o vacúolo ou a parede celular (Bartholomew *et al.*, 2002; Hatzios, 1991). Os transportadores ABC (ATP binding cassette) são o grupo mais comum de transportadores envolvidos na desintoxicação da fase III, responsáveis pelo transporte de substâncias através das membranas utilizando energia por meio da hidrólise de ATP (Yuan; Tranel; Stewart, 2007). De acordo com Bartholomew *et al.* (2002), a Fase IV da metabolização também pode ocorrer, sendo o processo responsável pela posterior substituição, degradação e/ou recuperação parcial dos conjugados.

No processo de metabolização de um determinado herbicida, a participação das P450s pode não necessariamente conferir resistência a esse produto, seja pelas baixas taxas de metabolismo do P450 ou pela fitotoxicidade dos produtos derivados dessas reações. Os danos às culturas poderão ser evitados se as reações da Fase II de conjugação forem bem-sucedidas na realização de desintoxicação adicional. O metabolismo catalisado por P450 de um herbicida não resultará em aumento da resistência ao herbicida se a fitotoxicidade do metabólito for igual ou maior que a da molécula original (Cobb; Reade, 2011; Siminszky, 2006).

As reações oxidativas dos pesticidas em plantas são frequentemente reações primárias que podem resultar na desintoxicação ou ativação desses compostos (Shimabukuro; Lamoureux; Frear, 1982). Alguns herbicidas sofrem bioativação dentro das células vegetais, esse é o processo pelo qual um pró-herbicida, muitas vezes moléculas inativas como herbicidas, são enzimaticamente convertidas em compostos fitotóxicos (Cobb; Reade, 2011).

Os inibidores da ACCase são exemplos de herbicidas que são normalmente formulados como ácido de ésteres carboxílicos e ativados por reações com enzimas hidrolíticas (Monquero; Hirata, 2014). O herbicida clomazone também sofre processo de metabolização mediado pelas enzimas do citocromo P450, que convertem a

molécula em metabólitos fitotxicamente ativos (Ferhatoglu; Avdiushko; Barrett, 2005).

### **2.3.2 Clomazone**

Dentre os principais herbicidas registrados para a cultura da cana-de-açúcar, destaca-se o clomazone, pertencente ao grupo químico isoxazolidinonas esse herbicida inibe a biosíntese de carotenoides. É considerado um pró-herbicida uma vez que precisa ser convertido no metabólito 5-ceto-clomazone para apresentar efeitos fitotóxicos. A ativação do clomazone na molécula biologicamente ativa 5-ceto-clomazone requer a oxidação do composto original e as oxigenases que normalmente desintoxicam um substrato xenobiótico convertem o produto em seu metabólito tóxico (Tenbrook; Tjeerdema, 2006).

A via metabólica do herbicida clomazone foi demonstrada por ElNaggar *et al.* (1992) que evidenciou o processo de hidroxilação da molécula de clomazone levando a formação de 5-OH-clomazone, que após mais uma etapa de oxidação deu origem ao metabólito 5-ketoclomazone. Estudos realizados por Mueller *et al.* (2000) evidenciam que o clomazone não tem efeito na inibição de carotenoides, enquanto o metabólito 5-ketoclomazone foi responsável por inibir 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS), enzima chave na rota de síntese dos carotenoides, demonstrando que este metabólito é a molécula biologicamente ativa do herbicida.

Duas vias metabólicas distintas foram elucidadas para a formação de difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalilo (DMAPP), precursores metabólicos essenciais para a biossíntese de isoprenóides: a via do mevalonato, e a via não mevalonato do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). Esta via isoprenóide plastídica não mevalonato tem início com a formação de 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP) através da condensação de piruvato e D-gliceraldeído 3-fosfato (D-GAP), catalisada pela DXP sintase (DXS). O segundo passo é a transformação de DXP em 2-C metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) que consiste em um rearranjo C-C e uma etapa de redução, esse processo é catalisado pela enzima DXP redutoisomerase (DXR) (Lichtenthaler *et al.*, 2000; Matsue *et al.*, 2010; Sponsel, 2002). Nas plantas a via MEP é responsável pela biossíntese dos isoprenóides plastídicos, como carotenóides e fitol (Dayan; Zaccaro, 2012; Lichtenthaler *et al.*, 2000).

Um papel importante dos carotenoides é o de proteger a clorofila da fotooxidação. Após a síntese da clorofila, a mesma se torna eletronicamente excitada e é transformada da forma singlet para a forma triplet, mais reativa. A energia desta forma reativa de clorofila normalmente é dissipada através dos carotenoides. Quando os carotenoides não estão presentes, estas clorofilas no estado triplet iniciam reações de degradação, não sendo capazes de se manterem funcionais e estáveis. (HESS, 2000). Como consequência, o sintoma mais característico desse grupo de herbicidas é o albinismo ou despigmentação das folhas (Oliveira Júnior, 2011).

Estudos demonstram a conversão de clomazone em compostos derivados de OH, que podem ser os produtos de uma reação do citocromo P450. Evidências da bioativação do clomazone pela P450 foram obtidas em diversas culturas (Ferhatoglu; Barrett, 2006). O uso de inseticidas organofosforado, conhecidos por inibir a desintoxicação mediada por P450, reduziu o metabolismo de clomazone em seu metabólito tóxico, protegendo plantas de milho e algodão (Ferhatoglu; Avdiushko; Barrett, 2005).

Culpepper *et al.* (2001) demonstram que a proteção do algodão da ação de clomazone pelos inseticidas organofosforados pode ser parcialmente devida a um efeito no metabolismo do clomazone, uma vez que os brotos das plantas protegidas pela aplicação do inseticida continham uma porcentagem maior da molécula inicial do herbicida do que as plantas que receberam apenas clomazone. Yasuor *et al.* (2008), também demonstraram que a proteção por inibidores de P450 sugere que a ativação oxidativa de clomazone é necessária para toxicidade do herbicida. O tratamento de plantas resistentes e suscetíveis de *Echinochloa phyllopogon* com um inseticida inibidor da P450 antes da aplicação de clomazone reduziu a sensibilidade dessas plantas ao herbicida.

O processo de metabolização dos herbicidas pode estar diretamente relacionado à sua atividade e seletividade. O metabolismo diferencial de herbicida nas plantas é um fator de seletividade entre as culturas e as plantas daninhas (USUI, 2001). A sensibilidade ao herbicida associada à alta atividade metabólica é indicativa de um pró-herbicida, como o caso do clomazone (Tenbrook; Tjeerdema, 2006).

Estudos realizados para determinar a absorção e o metabolismo do herbicida clomazone na cultura da soja considerada tolerante ao herbicida e do algodão considerado suscetível, relataram níveis significativamente maiores de clomazone absorvido pela soja quando comparado ao algodão, evidenciando que neste caso a

absorção diferencial não é responsável pela seletividade. Os metabólitos do herbicida foram isolados da soja e do algodão e testados quanto à atividade biológica usando folhas de *Abutilon theophrasti* Medic, espécie sensível à ação do herbicida. Os metabólitos isolados do algodão reduziram em aproximadamente 50% os níveis de clorofila de *Abutilon theophrasti* Medic, enquanto que os metabólitos da soja não promoveram reduções (Norman; Liebl; Widholm, 1990).

TenBrook e Tjeerdema (2005) avaliando as diferenças na sensibilidade à clomazone entre a planta daninha *Echinochloa oryzoides* e a cultura do arroz (*Oryza sativa*) observaram que *E. oryzoides* foi mais sensível à ação do herbicida, apresentando redução mais evidente no crescimento e nos níveis de carotenoides. As diferenças na sensibilidade à clomazone estão relacionadas ao metabolismo diferencial, neste caso *E. oryzoides* metabolizou qualitativa e quantitativamente mais clomazone do que o arroz, sendo compatível com a ação de um herbicida metabolicamente ativado (Tenbrook; Tjeerdema, 2006).

Embora o clomazone seja recomendado para uso em plantações de cana-de-açúcar, as cultivares apresentam tolerância diferencial à esse herbicida (Barcellos Júnior et al., 2017). Diversos estudos têm demonstrado a tolerância diferencial de variedades de cana-de-açúcar aos herbicidas, em diferentes métodos de plantio e posicionamentos dos produtos e este fato pode ser atribuído às características genéticas específicas de cada material (Sabbag et al., 2017). Por consequência, as plantas podem apresentar frequentes problemas de fitointoxicação, podendo levar a redução da produtividade do canavial (Procópio; Silva; Vargas, 2008).

Martins et al. (2010) afirmam que diferentes padrões de crescimento e recuperação da intoxicação podem ser observados entre as variedades de cana-de-açúcar e esse comportamento de recuperação não está diretamente relacionado com a intensidade inicial de fitointoxicação. Dessa forma, para avaliar a toxicidade de determinada cultura após a aplicação de herbicidas é imprescindível avaliar não apenas a fitointoxicação provocada pela ação do produto, mas também os efeitos que estas injúrias podem apresentar sobre o desenvolvimento e a produtividade da planta cultivada (Negrisoli et al., 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia - NUPAM, pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu/SP.

Quatro variedades de cana-de-açúcar (SP80-3280, RB97-5375, RB93-579 e RB97-5201) foram plantadas utilizando-se mudas pré-brotadas (MPB). Cada unidade experimental foi constituída por vasos plásticos com capacidade para 2,8 litros, preenchidos com a mistura de 3:1 de solo e substrato Carolina<sup>®</sup> (composto de turfa de esfagno, vermiculita e casca de arroz carbonizada), onde as mudas foram transplantadas. O solo utilizado apresentou as seguintes características químicas: pH (CaCl<sub>2</sub>) = 4,2; MO = 17 g dm<sup>-3</sup>; P = 4 mg dm<sup>-3</sup>, K = 0,57 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, Ca = 4,0 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, Mg = 2,0 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, H+Al<sup>+3</sup> = 28,0 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>. Quanto aos atributos físicos: areia = 210 mg dm<sup>-3</sup>, argila = 692 mg dm<sup>-3</sup> e silte = 98 mg dm<sup>-3</sup>.

O clomazone (Gamit<sup>®</sup> - 500 g.i.a. L<sup>-1</sup>) foi aplicado utilizando um pulverizador automatizado em ambiente fechado, com uma estrutura metálica para o suporte da barra de pulverização com 2 metros de comprimento. A barra percorre por 6 metros com auxílio de um motor elétrico e possui um modulador de frequência que controla a velocidade de trabalho. Foram utilizadas na barra quatro pontas XR 11002 VS, com espaçamento de 0,5 metros e altura de 0,5 metros em relação às plantas. A pressão de trabalho adotada foi de 150 kPa e velocidade de 3,6 km h<sup>-1</sup>, gerando um consumo de calda de 200 L ha<sup>-1</sup> (Figura 1).

Durante a aplicação o solo foi protegido para garantir a absorção apenas via foliar. A aplicação do clomazone ocorreu sete dias após o transplântio das mudas. As plantas foram mantidas em condições ambiente fora da casa-de-vegetação durante todo o período do ensaio.

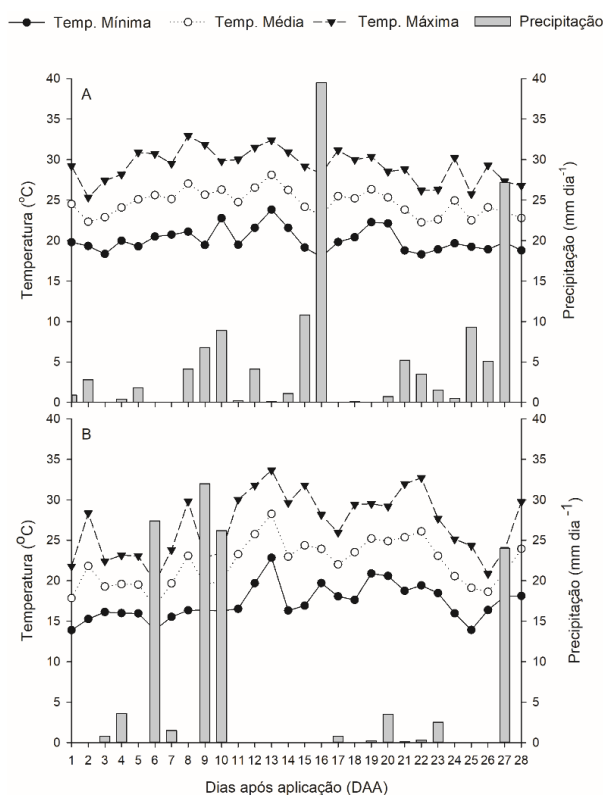
**Figura 1 - Aplicação de clomazone em quatro variedades de cana-de-açúcar.**



Três experimentos foram realizados com as mesmas características descritas anteriormente. Dois experimentos foram conduzidos para a determinação da sensibilidade das variedades de cana-de-açúcar através de avaliações morfológicas e fisiológicas após a aplicação da dose comercial de clomazone (Experimento 1) e de uma curva de doses do herbicida (Experimento 2). O Experimento 3 foi realizado para a determinação dos processos de absorção e metabolismo do clomazone nas variedades de cana-de-açúcar. Os Experimentos 1 e 3 foram realizados em duplicata em períodos distintos do ano. As condições meteorológicas durante a condução dos ensaios estão apresentadas na Figura 2.

No experimento 4, realizado para a determinação da deposição nas quatro variedades de cana-de-açúcar, as características são distintas e estão descritas no item 3.4.

**Figura 2 - Temperatura mínima, média, máxima e precipitação durante a condução dos experimentos. 1ª repetição Experimentos 1 e 3 (A), 2ª repetição Experimentos 1 e 3 e Experimento 2 (B)**



### 3.1 Experimento 1 - Fitointoxicação, taxa de transporte de elétrons e crescimento da cana-de-açúcar com aplicação de clomazone

O primeiro experimento foi realizado em delinemaneto experimental inteiramente casualizado com 5 repetições em esquema fatorial 4 x 2, sendo o primeiro fator as variedades de cana-de-açúcar e o segundo fator as doses de clomazone (0 e 1000 g i.a. ha<sup>-1</sup>). Foram realizadas avaliações de fitointoxicação, número de folhas e perfilhos, altura, taxa de transporte de elétrons (ETR) e eficiência fotoquímica efetiva do Fotossistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação do herbicida (DAA) e massa seca da parte aérea aos 28 DAA.

Para a avaliação de fitointoxicação foram utilizadas notas que variam de 0 a 100% (SBCPD, 1995), onde zero corresponde a ausência de injúrias e cem à morte da planta. A altura das plantas foi determinada através de medidas da base do colmo até o colarinho da última folha expandida (folha +1). As avaliações do fluxo de transporte de elétrons e eficiência fotoquímica efetiva do Fotossistema II foram

realizadas com um fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS 5p – Opti Sciences), as leituras foram realizadas no protocolo Yield mensurando-se duas repetições de leituras por planta.

Aos 28 DAA as plantas foram coletadas, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, durante 72 horas ou até obter massa constante. Posteriormente, o material foi pesado em balança de precisão (0,001g) para determinação da massa seca em cada um dos tratamentos.

Para as variáveis altura, número de folhas, número de perfilhos, ETR,  $\Phi_{PSII}$  e massa seca, foi realizado um cálculo de porcentagem considerando os valores obtidos nas plantas sem tratamento 100% e os valores das plantas tratadas em função dos valores da testemunha.

### **3.2 Experimento 2 - Curva de dose-resposta de clomazone em variedades de cana-de-açúcar**

O segundo experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições em esquema fatorial 4 x 8, ou seja, quatro variedades e oito doses do herbicida clomazone, as quais foram compostas por: 0; 250; 500; 1000; 2000; 4000; 8000 e 16000 g i.a. ha<sup>-1</sup>.

Aos 28 dias após a aplicação das doses de clomazone, foi realizada avaliação de fitointoxicação das variedades com notas que variam de 0 a 100% (SBCPD, 1995), onde zero corresponde a ausência de injúrias e cem à morte da planta. Também foi determinada a altura das plantas através de medidas da base do colmo até o colarinho da última folha expandida (folha +1). Posteriormente as plantas foram coletadas para determinação da massa seca da parte aérea.

### **3.3 Experimento 3 - Absorção e metabolização de clomazone em variedades de cana-de-açúcar**

O terceiro experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições em esquema fatorial 4 x 4 (variedades x tempos de coleta). O herbicida clomazone (1000 g i.a. ha<sup>-1</sup>) foi aplicado 7 dias após o transplântio das mudas e as plantas foram coletadas 1, 8, 24 e 72 horas após a

aplicação do herbicida (HAA) para determinação dos teores internos e externos do herbicida clomazone e dos metabólitos hydroxyclozomazone e ketoclozomazone.

As plantas coletadas nos diferentes tempos foram pesadas e submetidas a duas lavagens com 100 mL de água deionizada. A solução total resultante da lavagem (200 mL) foi homogeneizada para coleta de uma alíquota de 10 mL que foi armazenada em tubos falcons para posterior determinação da quantidade de herbicida depositado sobre as plantas (teor externo ou não absorvido). O material vegetal lavado foi armazenado para posterior preparo.

Para a determinação do teor externo dos compostos na planta, 3 mL da solução proveniente da água de lavagem foram filtrados com filtros Millipore 0,2 µm, transferindo o conteúdo para vials e levando-os para análise cromatográfica.

Para a determinação do teor interno de clomazone, hydroxyclozomazone e ketoclozomazone, o material vegetal armazenado foi macerado com nitrogênio líquido com auxílio de graal e pistilo. Foi pesada uma alíquota de 200 mg de cada amostra macerada, acondicionando-as em tubos falcon de 10mL, adicionando-se 10mL de uma solução contendo água e metanol (80:20 v/v). Os tubos foram submetidos a banho de ultrassom durante 30 minutos e centrifugados a 4.000 g por 5 minutos, posteriormente foi realizada a filtragem do sobrenadante das amostras com filtros Millipore 0,2 µm, transferindo o conteúdo para *vials* e levando-as para análise em LC-MS/MS (Figura 3).

**Figura 3 - Procedimentos para determinação do teor interno dos compostos. Maceração (A), pesagem (B), adição da solução extratora (C), sonicação (D), centrifugação (E) e filtragem (F) das amostras.**



Para a realização das análises foi utilizado um sistema LC-MS/MS, composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, que combina análise ultra-rápida e excelente performance de separação, com alta confiabilidade de resultados; equipado com duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 3200 Q TRAP (Applied Biosystems), híbrido triplo quadrupolo, onde Q1 e Q3 são utilizados como filtros de massa e Q2 é uma célula de colisão onde as moléculas intactas e fragmentos de Q1 são quebrados em fragmentos de massas menores, sendo que Q3 é definido para detectar apenas uma massa especial, que é um fragmento conhecido (filho) da molécula intacta (pai) de massa conhecida filtrada por Q1 (Figura 4).

Este é o modo quantitativo padrão utilizado para metabólito alvo, tendo como principais vantagens alta sensibilidade e reprodutibilidade, baixo ruído e medição simultânea de até 100 compostos (QUEIROGA, 2009).

**Figura 4 - Cromatógrafo líquido (Prominence UFLC) acoplado ao espectrômetro de massas (Triple Quad 4500, AB Sciex).**

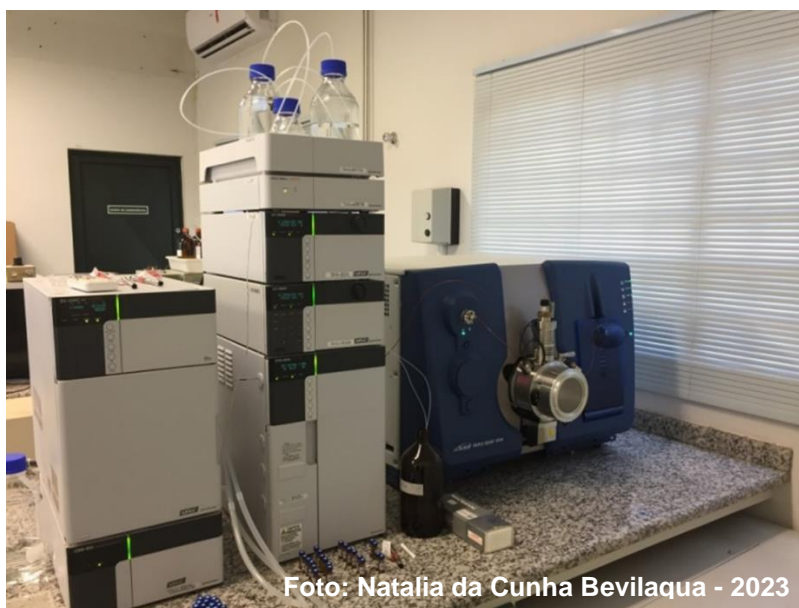


Foto: Natalia da Cunha Bevilaqua - 2023

As condições cromatográficas para a quantificação dos compostos estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1 - Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos**

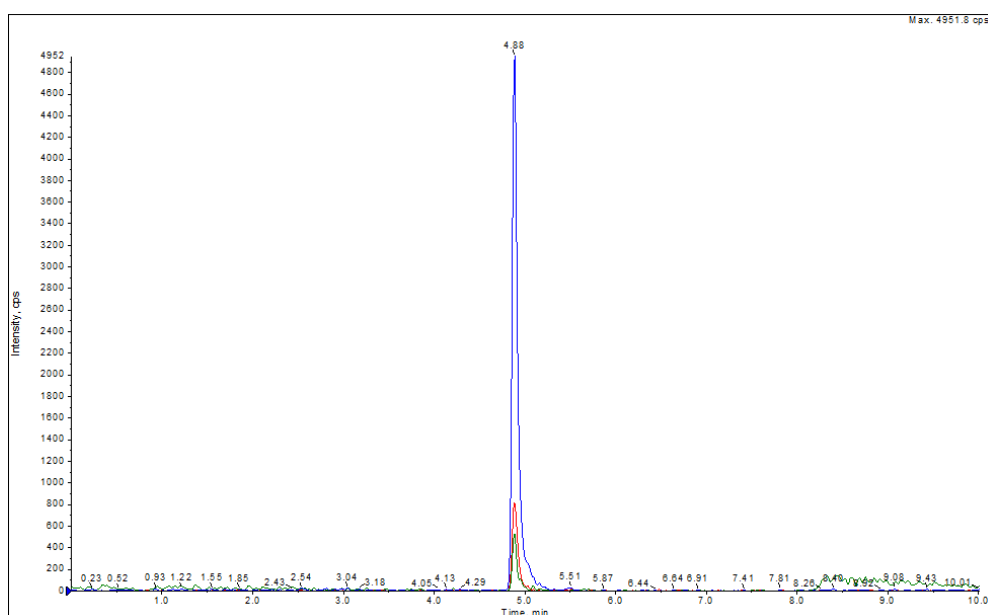
Coluna analítica	Synergi 2.5 $\mu$ Hydro-RP 100Å (50 x 4,6 mm)
Volume de injeção	20 $\mu$ l
Fase móvel (pH 7,0)	Fase A (FA) = Água com 0,1% ácido acético Fase B (FB) = Metanol com 0,1% ácido acético
Gradiente	0-1 minutos = 20% FB e 80% FA
	1-3 minutos = 95% FB e 5% FA
	3-6 minutos = 95% FB e 5% FA
	6-8 minutos = 20% FB e 80% FA
	8-10 minutos = 20% FB e 80% FA
Fluxo	0,6 ml min <sup>-1</sup>
Temperatura do forno	40°C

O tempo total de corrida para o clomazone, hydroxyclozomazone e ketoclozomazone foi de 10 minutos, com retenção na coluna cromatográfica 4,88; 4,31 e 4,13 minutos, respectivamente. A massa molecular do herbicida e dos metabólitos, bem como os fragmentos gerados das moléculas estão apresentados na Tabela 2. Os cromatogramas desses compostos estão apresentados nas Figuras 5 e 6. Os teores do herbicida e dos demais compostos foram expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca ( $\mu\text{g g ms}^{-1}$ ) das plantas.

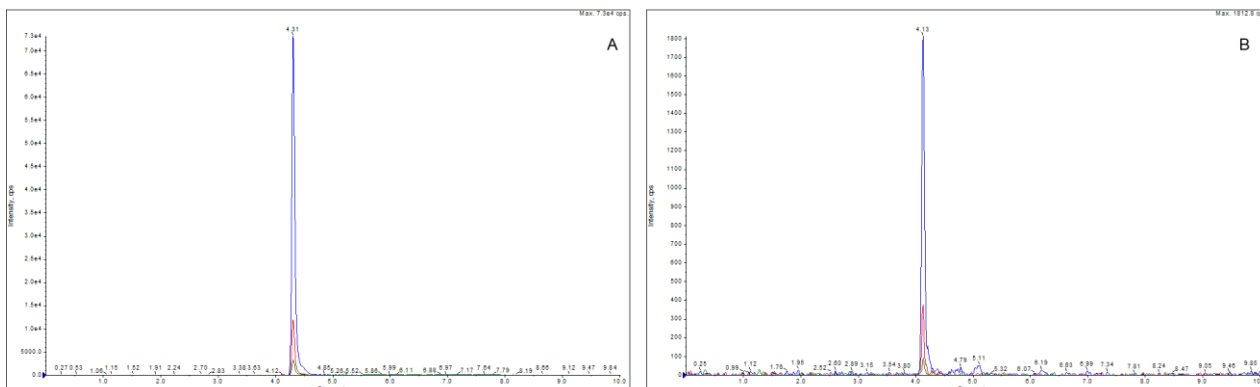
**Tabela 2 - Massa molecular e fragmentos dos compostos analisados**

Composto	Massa molecular	Fragmento
Clomazone	240,200	125,100
		89,100
		99,100
Hydroxyclozomazone	256,062	125,000
		89,200
		63,200
Ketoclozomazone	254,062	125,000
		89,200
		63,200

**Figura 5 - Cromatograma obtido para o herbicida clomazone ( $12,5 \text{ ng mL}^{-1}$ )**



**Figura 6 - Cromatograma obtido para os metabólitos hydroxyclozomazone (A) e ketoclozomazone (B) (12,5 ng mL<sup>-1</sup>)**



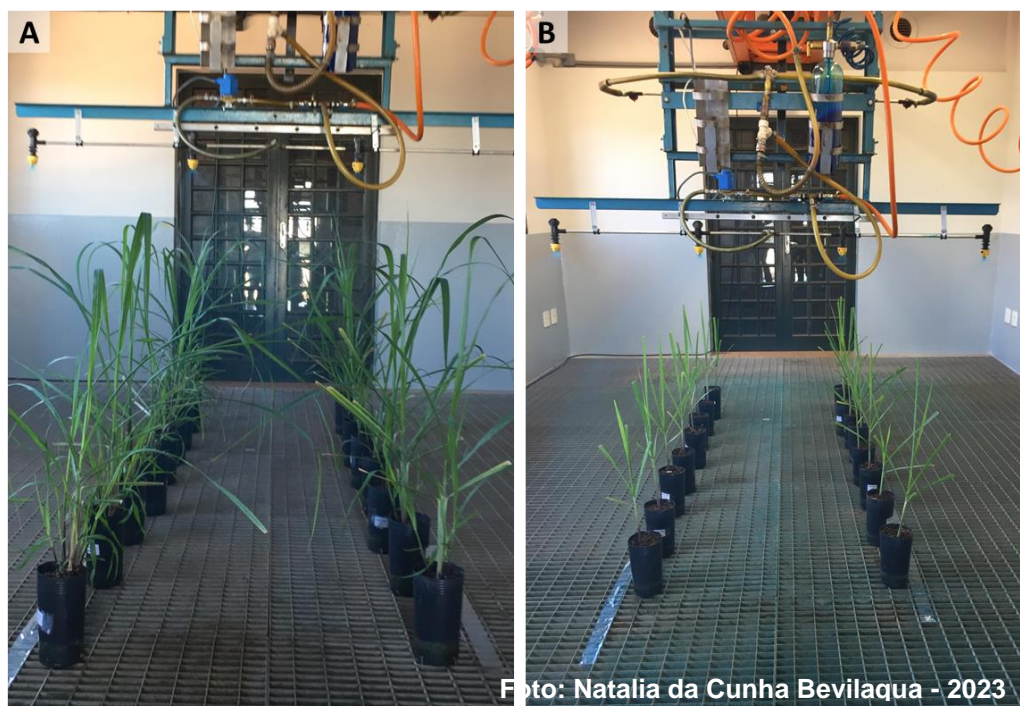
### 3.4 Experimento 4 - Deposição da calda de pulverização em variedades de cana-de-açúcar

O quarto experimento foi realizado no esquema fatorial 4 x 2, sendo o primeiro fator as 4 variedades de cana-de-açúcar (SP80-3280, RB97-5375, RB93-579 e RB97-5201) e o segundo fator 2 épocas de aplicação (7 e 30 dias após o transplante das mudas - DAT), com 8 repetições.

Cada unidade experimental foi constituída por vasos de 1,7 litros preenchidos com substrato Carolina<sup>®</sup>, composto de turfa de esfagno, vermiculita e casca de arroz carbonizada, com pH 5,7 ( $\pm 0,5$ ). As mudas pré-brotadas das quatro variedades de cana-de-açúcar foram transplantadas 30 e 7 dias antes da aplicação, para que a aplicação fosse realizada no mesmo momento para os dois grupos de plantas. No dia anterior a aplicação, foi realizada a medição de comprimento e largura de todas as folhas de cada planta, para posterior determinação da área foliar.

Para determinar a deposição, foi adicionado à calda do herbicida clomazone (1000 g i.a. ha<sup>-1</sup>) o traçador corante Azul Brilhante na concentração de 2000 ppm, A aplicação foi realizada utilizando-se o mesmo sistema e condições descritas anteriormente para o pulverizador automatizado (Figura 7).

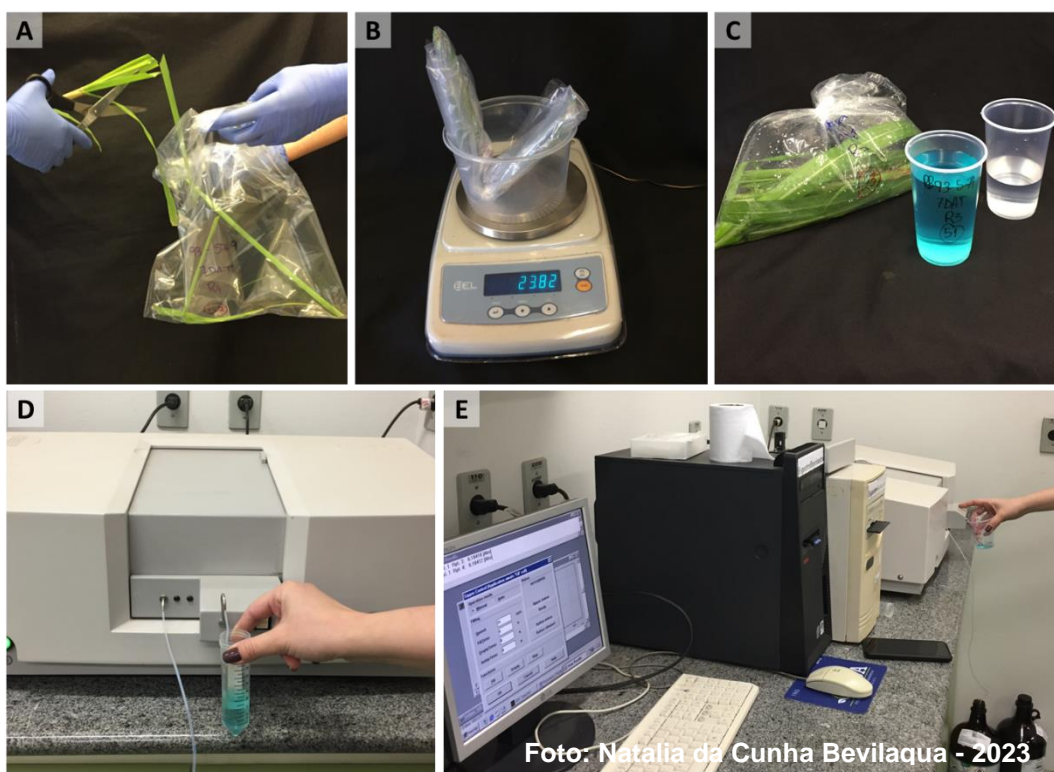
**Figura 7 - Aplicação do traçador em variedades de cana-de-açúcar aos 30 DAT (A) e 7 DAT (B)**



Imediatamente após a aplicação, a parte aérea das plantas foi coletada, pesada e submetida a duas lavagens com 500 mL de água deionizada. A solução resultante dessas lavagens (1000 mL) foi homogeneizada e uma alíquota de 15 mL foi coletada e armazenada em tubos de ensaio.

Nessas alíquotas foram realizadas leituras de absorvância, por espectrofotometria, por meio de um espectrofotômetro de duplo feixe UV visível (Cintra 40, GBC Scientific Equipment Ltd.), no comprimento de onda de 630 nm (Figura 8). Em conjunto às amostras, foi preparada uma curva padrão, com concentrações de 0; 0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 ppm do traçador, na qual também foi determinada a absorvância, possibilitando assim a correlação da absorvância com a concentração do traçador.

**Figura 8 – Coleta da parte aérea (A), pesagem (B), lavagem (C) e leitura no espectrofotômetro (D, E)**



### 3.5 Análise dos resultados

Uma vez que os experimentos 1 e 3 foram realizados em duplicata, os dados morfológicos e bioquímicos obtidos foram submetidos à análise de variância de forma independente e posteriormente aplicou-se o teste de homogeneidade das variâncias residuais ( $F_{\text{máximo}}$ ) (Hartley, 1950). Comprovada a homogeneidade entre os experimentos, prosseguiu-se com a análise conjunta, e realizou-se uma nova análise de variância, em que os dados foram agrupados e considerou-se um experimento com dez repetições para cada parâmetro analisado.

Para os dados de fitotoxicidade, número de folhas, perfilhos, altura, taxa de transporte de elétrons e eficiência fotoquímica do PSII, as médias foram comparadas pelo teste t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ) com auxílio do programa estatístico Sisvar. Para os compostos bioquímicos (clomazone, ketocloromazone e hydroxycloclomazone) as médias foram plotadas e adicionado o intervalo de confiança ( $p \leq 0,1$ ).

Para o experimento de curva dose-resposta, os resultados da avaliação de fitointoxicação, altura e massa seca foram inicialmente submetidos à análise de

variância ( $p \leq 0,05$ ), quando significativas pelo teste F, os dados foram ajustados no modelo de regressão não linear proposto por (Streibig, 1988). Quando não significativo, aplicou-se o teste t para comparação das médias.

Modelo de 3 parâmetros de Streibig (1988):

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

Em que:

$y$  = controle percentual;

$x$  = dose do herbicida ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) e;

$a$ ,  $b$  e  $c$  = parâmetros estimados da equação, de tal forma que:

$a$  = amplitude existente entre o ponto máximo e o ponto mínimo da variável;

$b$  = dose que proporciona 50% de resposta da variável;

$c$  = declividade da curva ao redor de  $b$ .

Para todas as variáveis analisadas foram calculados os intervalos de confiança (média  $\pm$  intervalo de confiança) pelo teste t através da equação:

$$IC = \frac{t \cdot DP}{\sqrt{n}}$$

Onde,  $t$  refere-se ao valor de  $t$  tabelado ( $p \leq 0,05$ ),  $DP$  o desvio padrão dos dados e  $n$  o número de amostragens.

No estudo de deposição, os dados foram convertidos em  $\text{mg kg}^{-1}$  de massa fresca ( $\text{mg kg mf}^{-1}$ ) e submetidos à análise de variância, quando significativos as médias foram comparadas pelo teste t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ). Ao analisar a frequência acumulada dos dados de deposição do traçador, os dados foram convertidos em  $\mu\text{L cm}^{-2}$  do traçador e  $\text{ng cm}^{-2}$  do clomazone, posteriormente foram ajustados aos modelos de regressão não-linear de Gompertz, desenvolvido por Gompertz (1825), seguindo procedimentos adaptados por Velini (1995):

$$F = e^{[a - e^{(-b - c \cdot x)}]}$$

O valor de  $F$  representa a frequência acumulada da deposição dos herbicidas em percentagem. O  $a$ ,  $b$  e  $c$  correspondem aos parâmetros da equação, sendo a assíntota máxima da curva representada pela expressão  $e^a$ ; o deslocamento da curva ao longo do eixo  $x$  é representado pelo módulo do parâmetro  $b$ ; e a inclinação ou concavidade da curva em relação à frequência acumulada, pelo parâmetro  $c$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento 1 - Fitointoxicação, taxa de transporte de elétrons e crescimento da cana-de-açúcar com aplicação de clomazone

Ao analisar a fitointoxicação das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar após a aplicação do clomazone, foi possível verificar diferenças significativas entre as quatro variedades estudadas em todos os períodos de avaliação (Tabela 3).

**Tabela 3 - Análise de variância dos valores de fitointoxicação aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) de clomazone**

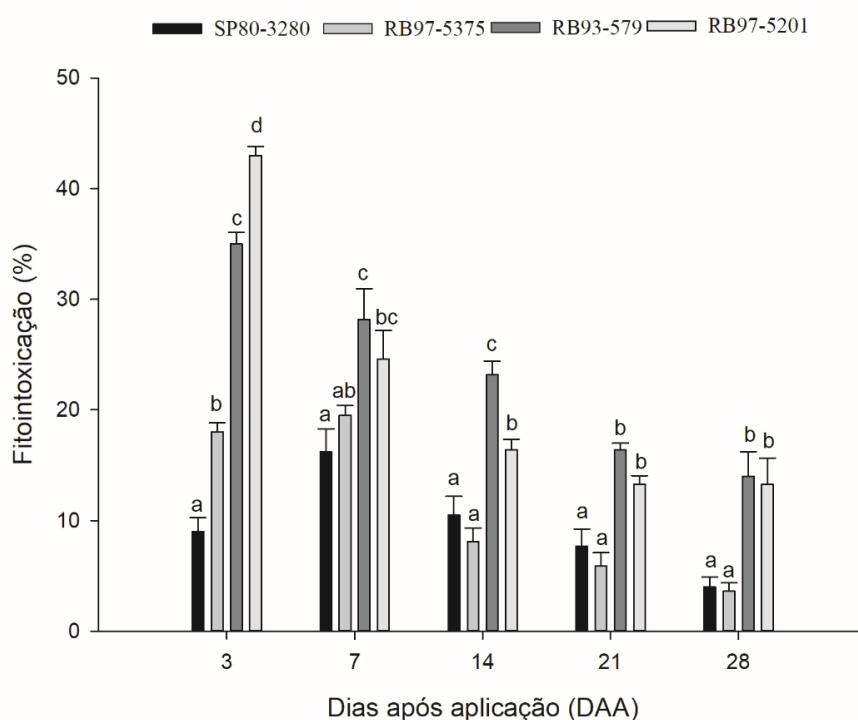
FV	GL	Quadrado Médio				
		3 DAA	7 DAA	14 DAA	21 DAA	28 DAA
		<b>Fitointoxicação</b>				
<b>Variedade</b>	3	2409,1667**	283,4250**	454,1667**	237,4250**	324,4917**
<b>Resíduo</b>	36	10,0000	48,6139	16,9833	11,8194	29,5139
<b>CV (%)</b>		12,05	31,51	28,32	31,76	62,27

<sup>ns</sup> não significativo; \* significativo a  $p \leq 0,05$  e a \*\*  $p < 0,01$

Ao avaliar as porcentagens de fitointoxicação nas quatro variedades de cana-de-açúcar em diferentes períodos de avaliação foi possível observar que os primeiros efeitos visuais ocorreram na avaliação realizada aos 3 DAA (Figura 9), com sintomas característicos de albinismo nas folhas mais jovens, que posteriormente evoluíram para sintomas de necrose principalmente nas extremidades das folhas. Sintomas similares foram relatados por Zera *et al.* (2011), após a aplicação de clomazone em diversas variedades de cana-de-açúcar os autores observaram amarelecimento e branqueamento das folhas jovens.

Esse é o sintoma mais marcante em plantas após o tratamento com esse grupo de herbicidas, a inibição da biossíntese de carotenoides resulta na degradação da clorofila, uma vez que uma função essencial dos carotenoides é a proteção da clorofila contra a fotodegradação, esse processo leva aos sintomas típicos de branqueamento em plantas dependendo da intensidade de iluminação (Hess, 2000; Sandmann, 2002).

**Figura 9 - Fitointoxicação (%) de quatro variedades de cana-de-açúcar aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de clomazone**



- Letras minúsculas iguais não diferem entre as variedades dentro de cada período de aplicação pelo teste t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ).

As maiores porcentagens de fitointoxicação foram observadas aos 3 DAA, havendo grande diferenciação de sensibilidade entre as variedades estudadas. As variedades SP80-3280 e RB97-5375 comportaram-se como as mais tolerantes, apresentando valores de injúria visual de 9% e 18% neste período de avaliação, respectivamente, já as variedades RB93-579 e RB97-5201 foram mais sensíveis à aplicação de clomazone, com valores de fitointoxicação de 35% e 43%, respectivamente.

Na avaliação de 7 DAA as plantas da variedade RB97-5201 apresentaram recuperação dos sintomas iniciais com valores de fitointoxicação próximos a 25%. Já a recuperação da variedade RB93-579 foi mais lenta, comportando-se como a variedade mais sensível nas avaliações realizadas aos 7 e 14 DAA, igualando-se posteriormente à variedade RB97-5201 até o fim do período de avaliação. Comportamento similar foi relatado por Barcellos Júnior *et al.* (2017), que observaram maior intensidade de injúria por clomazone na variedade RB93-579 mesmo na dose mais baixa do herbicida, sendo a variedade que apresentou as menores taxas de recuperação ao longo dos períodos de avaliação.

Sabbag *et al.* (2017) avaliando o efeito da aplicação de herbicidas em mudas pré-brotadas das variedades RB86-7515, RB85-5156, RB96-6928 e RB97-5201, observaram maior suscetibilidade à alguns herbicidas na variedade RB97-5201. A aplicação de clomazone realizada aos 3 dias após o transplântio resultou em fitointoxicação das mudas de 77% na avaliação realizada aos 60 DAA, já quando a aplicação foi realizada aos 10 dias após o transplântio, observou-se maior tolerância desta variedade aos herbicidas, sendo que aos 60 DAA a aplicação de clomazone provocou fitointoxicação de 25%.

Todas as variedades demonstraram tendência de recuperação das injúrias causadas pela aplicação de clomazone ao longo dos períodos de avaliação, aos 28 DAA as variedades SP80-3280 e RB97-5375 apresentaram valores abaixo de 5%, diferindo significativamente das variedades RB93-579 e RB97-5201 que apresentaram valores de fitointoxicação próximos a 15% (Figura 9). Richard Júnior (1996), também observou redução na porcentagem de superfícies cloróticas nas folhas de cana-de-açúcar aos 28 dias após a aplicação de clomazone, com o aparecimento de novas folhas desenvolvidas após a aplicação que não apresentaram sintomas de branqueamento.

Ferreira *et al.* (2012), avaliando a toxicidade de clomazone para quatro variedades de cana-de-açúcar, observaram os maiores valores de fitointoxicação entre os 7 e 21 dias após a aplicação do herbicida, com reduções dos sintomas a partir desse período. As variedades RB92-5345, RB85-5146 e SP80-1816 apresentaram comportamento semelhante com índices elevados de fitointoxicação, chegando a aproximadamente 60% aos 14 e 21 DAA, no entanto, observou-se a recuperação das plantas que apresentaram fitointoxicação de 20% na avaliação realizada aos 42 DAA. Já a variedade RB86-7515 apresentou menor sensibilidade ao clomazone, com valores de fitointoxicação em torno de 40% nas avaliações iniciais e redução para cerca de 5% na última avaliação.

A partir da análise do parâmetro fitointoxicação, foi possível diferenciar os níveis de sensibilidade entre as quatro variedades estudadas, uma vez que foi observada maior tolerância para as variedades SP80-3280 e RB97-5375 em todos os períodos de avaliação, quando comparado com o comportamento das variedades RB93-579 e RB97-5201, que se mostraram mais sensíveis à ação do clomazone (Figura 9).

Ao analisar os parâmetros altura, número de folhas, número de perfilhos, taxa de transporte de elétrons e eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema II, foi possível verificar diferenças significativas entre as variedades em pelo menos um dos períodos de avaliação (Tabela 4).

**Tabela 4 - Análise de variância dos valores de altura, número de folhas, número de perfilhos, taxa de transporte de elétrons, eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) de clomazone e da massa seca aos 28 DAA**

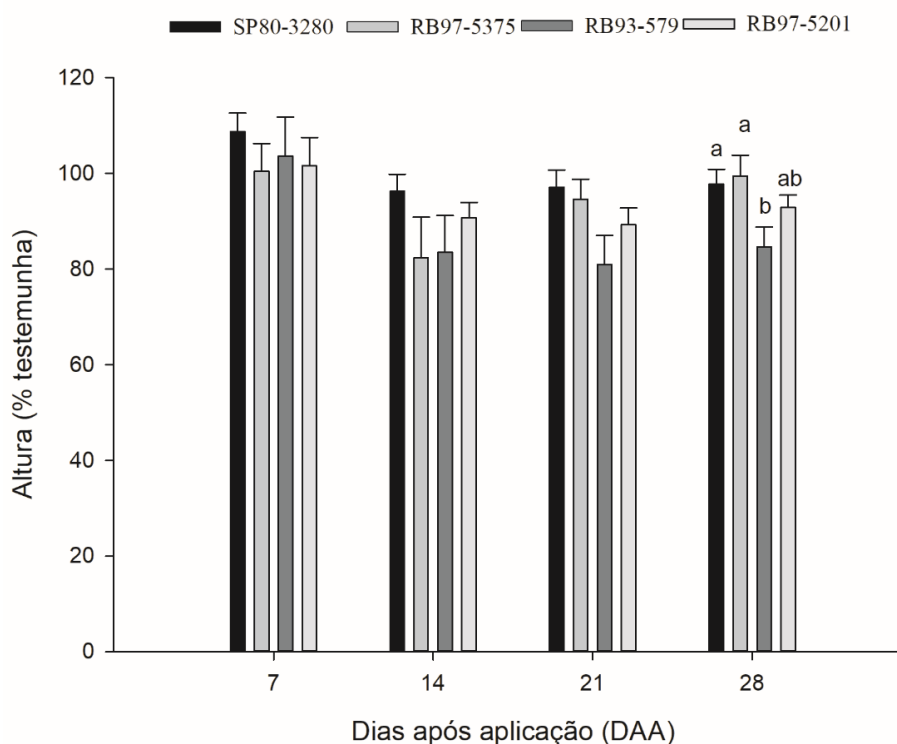
FV	GL	QMe			
		7 DAA	14 DAA	21 DAA	28 DAA
<b>Altura</b>					
<b>Variedade</b>	3	135,5317 <sup>ns</sup>	425,8887 <sup>ns</sup>	510,7756 <sup>ns</sup>	439,0012*
<b>Resíduo</b>	36	376,3975	386,5261	199,0226	131,5638
<b>CV (%)</b>		18,72	22,28	15,59	12,24
<b>Número de Folhas</b>					
<b>Variedade</b>	3	1115,0549**	347,4775 <sup>ns</sup>	225,6355 <sup>ns</sup>	1889,6387**
<b>Resíduo</b>	36	225,5613	298,9389	314,6932	138,4889
<b>CV (%)</b>		17,94	23,20	23,66	15,42
<b>Número de Perfilhos</b>					
<b>Variedade</b>	3	10261,2789**	7463,6655**	6859,1462**	2328,7120**
<b>Resíduo</b>	36	1066,8686	1189,3298	428,1834	250,4673
<b>CV (%)</b>		46,55	54,03	32,07	20,13
<b>ETR</b>					
<b>Variedade</b>	3	8895,2983**	171,6730 <sup>ns</sup>	74,0651 <sup>ns</sup>	103,6166 <sup>ns</sup>
<b>Resíduo</b>	36	319,7185	250,2473	56,0397	41,3783
<b>CV (%)</b>		36,79	18,03	7,41	6,50
<b><math>\Phi_{PSII}</math></b>					
<b>Variedade</b>	3	6229,2693**	166,3373 <sup>ns</sup>	240,3998*	83,3698 <sup>ns</sup>
<b>Resíduo</b>	36	640,8942	241,6487	67,8121	39,7512
<b>CV (%)</b>		52,88	17,77	8,12	6,38
<b>Massa seca</b>					
<b>Variedade</b>	3	-	-	-	2848,9875**
<b>Resíduo</b>	36	-	-	-	89,4907
<b>CV (%)</b>		-	-	-	13,31

<sup>ns</sup> não significativo; \*significativo a  $p \leq 0,05$  e a \*\* $p < 0,01$

Em relação à altura das plantas, pode-se observar que não houve diferença significativa entre as variedades nos três primeiros períodos de avaliação (7, 14 e 21 DAA). Na avaliação realizada aos 7 dias após a aplicação de clomazone, todas as variedades apresentaram crescimento similar ao observado na testemunha (Figura 10). Os elevados sintomas de fitointoxicação observados já na avaliação de 3 DAA

(Figura 9) não refletiram em alterações no desenvolvimento inicial das mudas pré-brotadas (Figura 10).

**Figura 10 - Altura de plantas (% em relação à testemunha) de quatro variedades de cana-de-açúcar (% em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de clomazone**



- Letras minúsculas iguais não diferem entre as variedades dentro de cada período de aplicação pelo teste t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ).

A diferenciação de crescimento entre as variedades evidenciou-se a partir da avaliação de 21 DAA, sendo que as variedades SP80-3280 e RB97-5375 apresentaram valores de altura de 97% e 95% em relação às suas testemunhas, respectivamente, enquanto nas variedades RB93-579 e RB97-5201 foi observado menor desenvolvimento, com valores de 81 e 89%, respectivamente.

O mesmo comportamento se manteve na avaliação realizada aos 28 DAA, no entanto, houve diferenças significativas de crescimento entre as variedades. O maior desenvolvimento em altura foi observado para as variedades RB97-5375, SP80-3280 e RB97-5201, que apresentaram valores de 99%, 98% e 92% em relação às suas testemunhas, respectivamente. A variedade RB93-579 se mostrou mais sensível à aplicação de clomazone quando esse parâmetro foi analisado, apresentando valores de 85% em relação à testemunha.

Reduções significativas de altura em mudas pré-brotadas de cana de açúcar após a aplicação com clomazone também foram observadas por Sabbag *et al.* (2017), a aplicação do herbicida 3 dias após o transplântio da variedade RB97-5201, provocou reduções na estatura de plantas de aproximadamente 48% quando comparadas à testemunha, já quando o clomazone foi aplicado 10 dias após o transplântio, observou-se menor sensibilidade com reduções em altura de aproximadamente 20%.

Ferreira *et al.* (2010b) estudando a tolerância de variedades SP de cana-de-açúcar à aplicação de dez herbicidas em pós emergência inicial, observaram maior tolerância da variedade SP80-3280. Aos 21 dias após a aplicação de clomazone, as plantas dessa variedade apresentaram valores de altura e massa seca muito próximos à testemunha (91,23% e 93,55%, respectivamente), corroborando com os resultados encontrados nessa pesquisa.

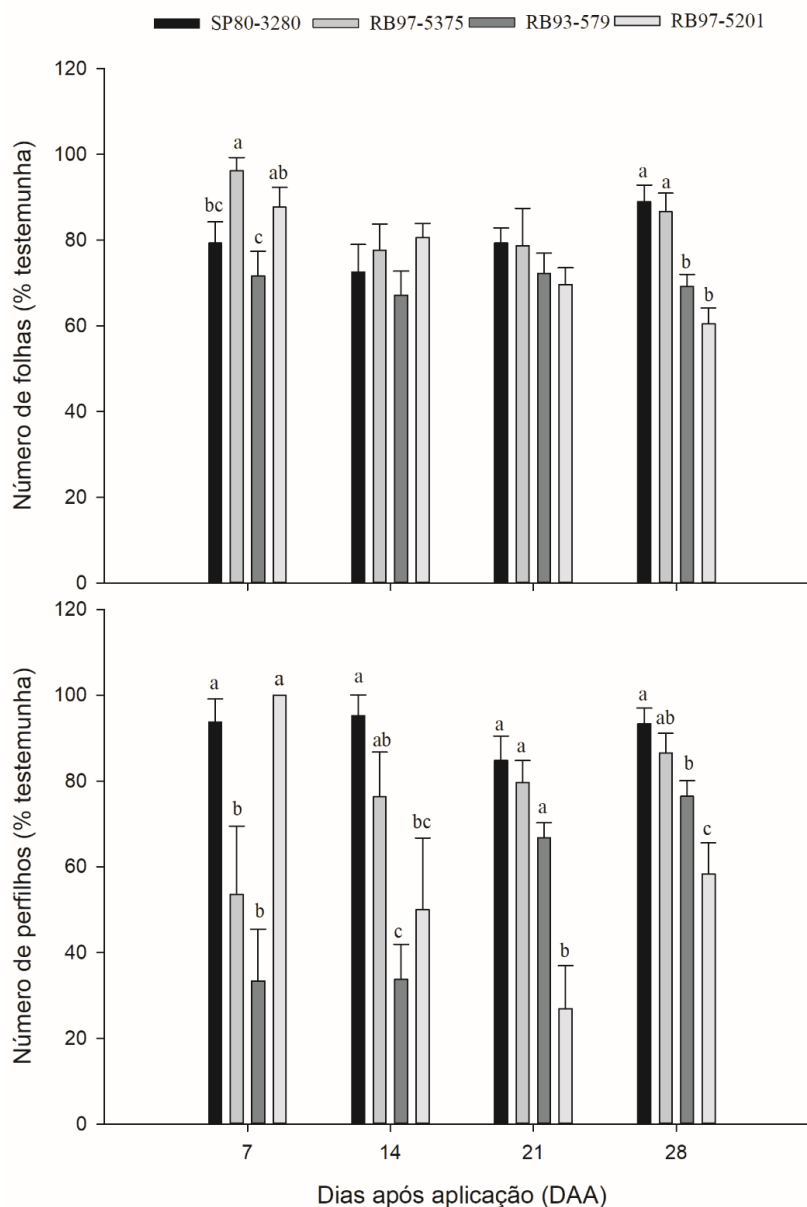
Avaliando-se o número de folhas após a aplicação de clomazone, foi possível observar diferença significativa entre as variedades nas avaliações de 7 e 28 DAA (Figura 11). Aos 7 dias após a aplicação de clomazone, as variedades RB97-5375 e RB97-5201 não diferiram entre si, apresentando valores próximos aos encontrados em suas testemunhas (96% e 88%, respectivamente). A variedade SP80-3280 apresentou comportamento intermediário entre as variedades, com valores de 79% em relação à testemunha, já o menor número de folhas em relação a testemunha foi observado para a variedade RB93-579, com valores de aproximadamente 72%.

Na avaliação realizada aos 28 DAA, foi possível observar a mesma tendência de comportamento entre as variedades que ocorreu para os parâmetros de fitointoxicação e altura. A aplicação de clomazone gerou menor interferência no número de folhas para as variedades SP80-3280 e RB97-5375, que apresentaram reduções desse parâmetro de 11% e 13% em relação às suas testemunhas, respectivamente. Já as maiores reduções foram observadas para as variedades RB93-579 e RB97-5201, com valores de 31% e 39%, respectivamente (Figura 11).

Sabbag *et al.* (2017) observou reduções de área foliar com a aplicação de clomazone nas variedades RB96-6928 e RB97-5201, já as variedades RB86-7515 e RB85-5156 não apresentaram diferença significativa em relação à testemunha. Os maiores efeitos de clomazone na área foliar foram observadas para a variedade RB97-5201 com reduções em relação à testemunha de 45% e 28% nas aplicações realizadas aos 3 e 10 dias após o transplântio das mudas, respectivamente.

Em relação ao efeito da aplicação de clomazone no número de perfilhos das quatro variedades de cana-de-açúcar, foi possível observar diferenças significativas entre as variedades para todos os períodos de avaliação (Figura 11).

**Figura 11 - Número de folhas e perfilhos de quatro variedades de cana-de-açúcar (% em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de clomazone**



- Letras minúsculas iguais não diferem entre as variedades dentro de cada período de aplicação pelo teste t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ).

Na primeira avaliação realizadas aos 7 dias após a aplicação de clomazone, o menor desenvolvimento de perfilhos foi observado para as variedades RB97-5375 e RB93-579, com reduções de 46% e 67% em relação às suas testemunhas, já as

variedades SP80-3280 e RB97-5201 apresentaram número de perfilhos próximo ou igual ao encontrado na testemunha, esse comportamento se manteve para a variedade SP80-3280 durante todo o período de avaliação, se mostrando a variedade mais tolerante à ação do herbicida quando o parâmetro número de perfilhos foi avaliado (Figura 11). Resultados distintos foram encontrados por Ferreira *et al.* (2010b), a variedade SP80-3280 comportou-se como a mais tolerante à aplicação de clomazone em pós-emergência, no entanto, observou-se redução expressiva no número de perfilhos em relação a testemunha quando comparada com as variedades que se mostraram mais sensíveis à ação do clomazone. Os autores sugerem que a homogeneidade de perfilhos nas variedades mais sensíveis pode estar relacionada com grandes interferências nos perfilhos primários, levando à estímulos de emissão de novos perfilhos, fator este que explicaria o menor perfilhamento da variedade SP80-3280, mesmo apresentando os maiores valores de biomassa.

Aos 14 DAA, a variedade RB97-5375 recuperou-se, não diferindo significativamente das variedades SP80-3280 e RB97-5201. Já a variedade RB93-579 se manteve como a mais sensível a ação do herbicida, apresentando reduções de 66% no número de perfilhos em relação à testemunha, maiores reduções também foram observadas para RB97-5201, com valores de 50% em relação à testemunha (Figura 11).

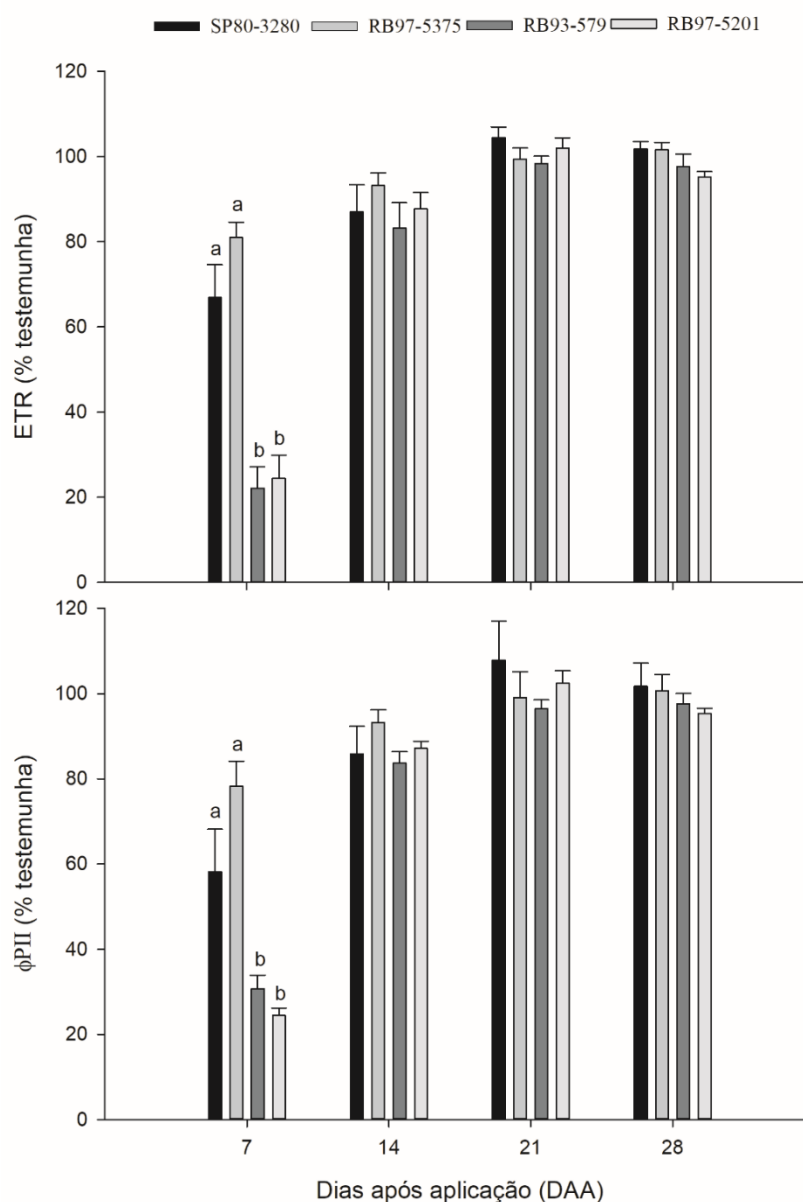
A variedade RB97-5201 apresentou decréscimo no número de perfilhos em relação a testemunha ainda mais expressivo aos 21 DAA, com reduções de 73% e se manteve com os menores valores na avaliação realizada aos 28 DAA, com reduções de 41%, enquanto as variedades SP80-3280, RB97-5375 e RB93-579 apresentaram reduções em relação às suas testemunhas de 7%, 13% e 23%, respectivamente, aos 28 DAA (Figura 11). Esses resultados diferem do encontrado por Barcellos Júnior *et al.* (2017), que não observaram reduções significativas no número de perfilhos das variedades RB93-579, RB96-6928 e RB86-7515 aos 28 dias após a aplicação de clomazone.

De maneira geral, a tolerância diferencial entre as quatro variedades observada por evidentes diferenças de fitointoxicação, altura e número de folhas, também se refletiu no desenvolvimento de perfilhos. Dias *et al.* (2017), correlaciona a intoxicação causada pelos herbicidas às mudas de cana-de-açúcar a reduções no número de perfilhos, uma vez que o herbicida que provocou as maiores injúrias com elevados

sintomas de fitointoxicação também foi o que causou a maior redução no número de perfilhos.

Diferenças entre as variedades também foram observadas com a avaliação da taxa de transporte de elétrons (ETR) e a eficiência fotoquímica do PSII ( $\Phi$ PSII), aos 7 dias após aplicação de clomazone causou efeitos mais expressivos levando à diferença significativa entre as variedades (Figura 12).

**Figura 12 - Taxa de transporte de elétrons - ETR e eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema II -  $\Phi$ PSII em quatro variedades de cana-de-açúcar (% em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de clomazone**



- Letras minúsculas iguais não diferem entre as variedades dentro de cada período de aplicação pelo teste t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ).

A avaliação da fluorescência da clorofila detecta a ocorrência de alterações na atividade do fotossistema II (PSII) das plantas, que podem ser causadas direta ou indiretamente pela ação de herbicidas, fornecendo informações importantes tanto para herbicidas que interferem diretamente no transporte de elétrons (inibidores PSI e PSII) quanto para herbicidas dependentes de luz, como por exemplo os inibidores da biossíntese de carotenóides, uma vez que esses herbicidas podem afetar a estabilidade do aparato fotossintético, interferindo indiretamente na fluorescência da clorofila (Araldi et al., 2015).

Dankov *et al.* (2009) constataram que em aplicações de inibidores da biossíntese de carotenoides, o aumento da concentração do herbicida leva a diminuição do teor de carotenoides e da quantidade de clorofilas, sendo que o grau de redução de carotenóides influenciou nas características de fluorescência e nas funções dos fotossistemas I e II. Resultados similares foram observados por Kaňa *et al.* (2004), o herbicida clomazone afetou o aparato fotossintético de cevada (*Hordeum vulgare* L.), causando redução no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos clorofila e carotenoides, resultando em mudanças nos espectros de emissão de fluorescência de clorofila e redução no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons.

A avaliação da taxa de transporte de elétrons no PSII (ETR), pode ser realizada para identificar o efeito de alguns herbicidas logo após a aplicação e pode ser feita com a utilização de um fluorômetro, que gera análises detalhadas de alterações da capacidade fotossintética da planta, bem como identifica lesões causadas ao aparelho fotossintético mesmo quando os sintomas ainda não são visíveis (Araldi et al., 2015).

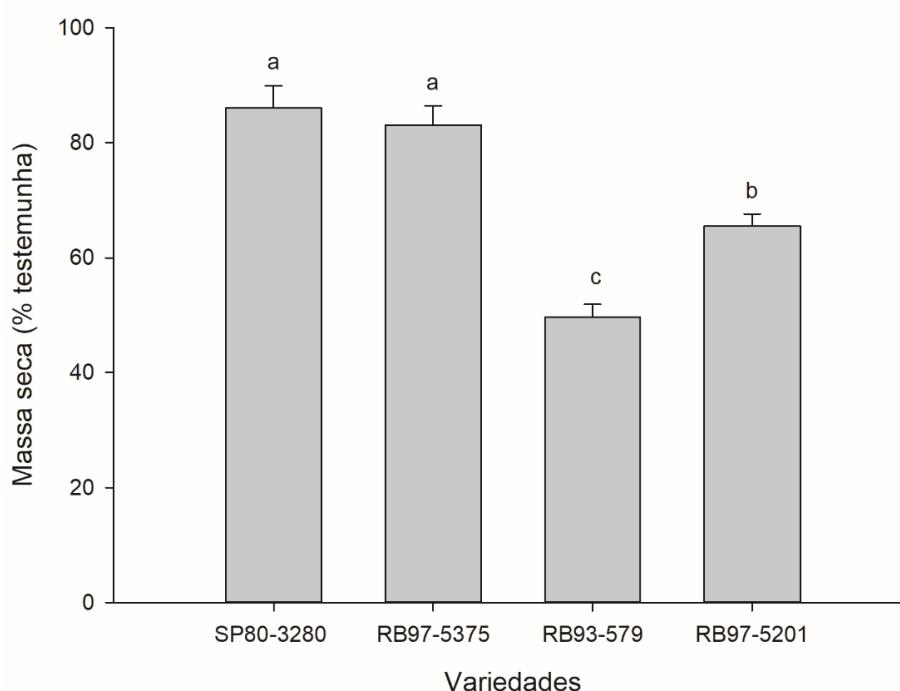
A aplicação de clomazone em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar provocou alterações na taxa de transporte de elétrons e na eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema II das quatro variedades estudadas. As reduções mais expressivas desses parâmetros ocorreram aos 7 DAA, sendo que os maiores efeitos foram observados para as variedades RB93-579 e RB97-5201 com reduções na taxa de transporte de elétrons em relação as respectivas testemunhas de 78% e 75% e da eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema II de 69% e 75%, respectivamente. Para a variedade SP80-3280 as reduções de ETR e  $\Phi$ PSII em relação à testemunha foram de 33% e 42%, respectivamente, já a variedade RB77-5375 foi menos afetada com reduções de 19% e 22% para ETR e  $\Phi$ PSII, respectivamente.

A partir de 14 DAA, observou-se recuperação de todas as variedades, uma vez que as reduções dos valores de ETR e  $\Phi$ PSII em relação à testemunha não

ultrapassaram 20%. Arantes *et al.* (2013) avaliando o efeito da aplicação de clomazone em pós-emergência das variedades SP81-3250, RB85-5156, RB85-5453, RB86-7515 e IACSP95-5000 na máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), observaram as maiores reduções da fluorescência da clorofila *a* entre 3 e 7 DAA, aos 3 DAA não houve diferença significativa entre as variedades, já aos 7 DAA as variedades RB855156 e RB855453 sofreram as maiores reduções, diferindo das demais. Entretanto, a partir deste período observou-se aumento da fluorescência da clorofila, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa.

O nível de interferência do clomazone no desenvolvimento das variedades de cana-de-açúcar gerou diferenças em fitointoxicação, altura, número de folhas e perfilhos, refletindo também no acúmulo de massa seca da parte aérea aos 28 dias após a aplicação (Figura 13).

**Figura 13 - Massa seca (% em relação à testemunha) de quatro variedades de cana-de-açúcar aos 28 dias após aplicação (DAA) de clomazone**



- Letras minúsculas iguais não diferem entre as variedades dentro de cada período de aplicação pelo teste t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ).

Para a variedade RB93-579, que apresentou recuperação mais lenta das injúrias provocadas pelo clomazone e o menor crescimento em altura, também foi possível observar os maiores prejuízos de desenvolvimento, com redução de 50% de

massa seca em relação à testemunha. Reduções expressivas também ocorreram para a variedade RB97-5201, a maior fitointoxicação inicial e menores quantidades de folhas e perfilhos desenvolvidos refletiram em reduções de 34% de massa seca em relação à testemunha. Já para as variedades SP80-3280 e RB97-5375, que demonstraram maior tolerância à ação do herbicida quando os demais parâmetros foram analisados, observou-se as menores reduções 14% e 17%, respectivamente, em relação a suas respectivas testemunhas (Figura 13). Esses resultados corroboram com os encontrados por Dias *et al.* (2017), que avaliando o efeito da aplicação de clomazone e outros herbicidas em pré-plantio de variedades de cana-de-açúcar no sistema MPB, observaram que, de maneira geral, a intoxicação provocada pelos herbicidas resultou em menor produção de massa seca de parte aérea e principalmente de raiz.

Sabbag *et al.* (2017) também observaram efeitos negativos da aplicação de clomazone na massa seca de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, com destaque para a variedade RB97-5201 que apresentou reduções de 76% em relação à testemunha quando a aplicação foi realizada 3 dias após o transplante e de 67% na aplicação de 10 dias após o transplante. Sendo assim, os autores concluíram que o estágio fenológico da cana-de-açúcar pode influenciar a tolerância das plantas aos herbicidas aplicados.

Zera *et al.* (2011) avaliando a tolerância de cultivares de cana-de-açúcar ao herbicida clomazone aplicado em pós-emergência, identificaram fitointoxicação em torno de 30% para todas as cultivares aos 15 dias após aplicação de clomazone, no entanto, todos os cultivares apresentaram grande capacidade de recuperação e não foram observados efeitos negativos do herbicida sobre a produção e as demais características tecnológicas da cultura. Barcellos Júnior *et al.* (2017) também observaram tolerância diferencial entre cultivares de cana-de-açúcar à aplicação do clomazone, com alterações no início de desenvolvimento da cultura. Entretanto, os sintomas iniciais de injúria reduziram com o tempo e não refletiram na produtividade e qualidade do produto colhido.

## 4.2 Experimento 2 - Curva dose resposta de clomazone em variedades de cana-de-açúcar

As variáveis fitointoxicação, altura e massa seca das quatro variedades de cana-de-açúcar foram ajustadas pelo modelo de regressão linear e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) demonstraram um bom ajuste do modelo (Tabela 5).

**Tabela 5 - Valores de quadrado médio (QMe), coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e constantes da equação de regressão para fitointoxicação, altura e massa seca das quatro variedades de cana-de-açúcar aos 28 dias após a aplicação (DAA) de diferentes doses de clomazone**

	28 DAA			
	SP80-3280	RB97-5375	RB93-579	RB97-5201
<b>Fitointoxicação</b>				
Dose	732,5107**	668,6857**	2496,8536**	1906,8429**
Regressão	500,7790**	458,8526**	1730,3749**	1307,8158**
$R^2$	0,9805	0,9803	0,9900	0,9798
<b>Constantes</b>				
a	31,9315	34,4270	61,1448	58,2991
b	-2,0379	-1,3623	-1,2457	-1,0845
x0	4043,8269	3953,7258	2250,7673	2823,5899
CV (%)	27,12	24,72	14,33	15,38
<b>Altura</b>				
Dose	328,8242**	932,6145**	1315,7374**	924,1608**
Regressão	224,9951**	593,9813**	880,1854**	636,0112**
$R^2$	0,9775	0,9099	0,9557	0,9831
<b>Constantes</b>				
a	100,7367	103,3404	102,0699	100,5095
b	0,8639	0,6026	0,4999	0,4233
x0	65278,2341	37009,5897	19416,2632	35598,2918
CV (%)	7,17	6,52	11,72	10,40
<b>Massa seca</b>				
Dose	2816,4539**	2808,6931**	3740,3849**	3363,9810**
Regressão	1892,393**	1855,588**	2593,118**	2274,878**
$R^2$	0,960	0,944	0,990	0,966
<b>Constantes</b>				
a	103,889	102,964	100,903	101,858
b	0,723	0,829	0,648	0,579
x0	6788,015	7856,582	1720,283	2046,468
CV (%)	14,40	14,07	18,75	18,91

ns não significativo; \*significativo a  $p \leq 0,05$  e a \*\* $p < 0,01$

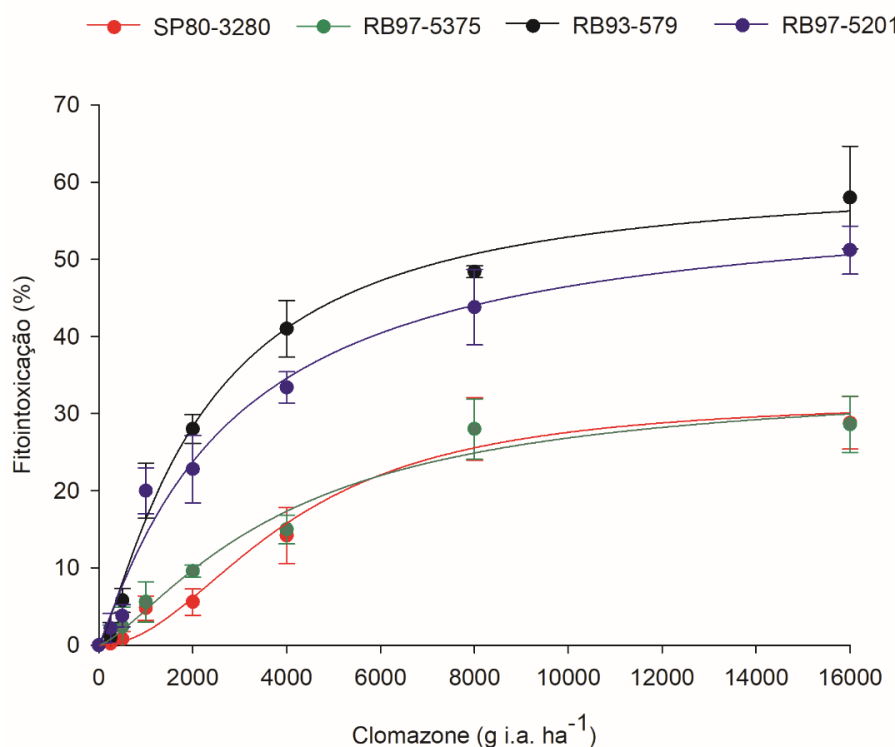
Para os parâmetros analisados com a curva dose resposta de clomazone, constatou-se o mesmo padrão de tolerância diferencial das variedades de cana-de-açúcar observado no Experimento 1, sendo as variedades SP80-3280 e RB97-5375 mais tolerantes e as variedades RB93-579 e RB97-5201 mais sensíveis às doses aplicadas do herbicida.

Em relação a fitointoxicação das plantas, os mesmos sintomas de branqueamento das folhas novas observados no Experimento 1 também ocorreram para todas as variedades estudadas. Barcellos Júnior *et al.* (2017), avaliando o efeito de cinco doses de clomazone aplicadas em pós-emergência de três variedades de cana-de-açúcar, observaram fitointoxicação em todas as doses e variedades avaliadas. Os sintomas também se caracterizaram pelo branqueamento dos tecidos jovens e posterior necrose, em alguns casos ocorreu a morte das folhas.

Na variedade mais sensível RB93-579 as injúrias iniciais foram observadas a partir da dose de 250 g i.a. ha<sup>-1</sup>. Já para as demais variedades as injúrias iniciaram-se a partir da dose de 1000 g i.a. ha<sup>-1</sup>, dose utilizada no experimento 1. A fitointoxicação das plantas diminuiu ao longo do tempo devido a emissão de novas folhas e perfilhos que não apresentaram os sintomas característicos de branqueamento, sendo possível observar recuperação quase total das plantas nas doses mais baixas do herbicida (250 e 500 g i.a. ha<sup>-1</sup>) com injúrias máximas de 2,5% para as variedades SP80-3280 e RB97-5375 e de 5,8% nas variedades RB93-579 e RB97-5201 na avaliação realizada aos 28 DAA (Figura 14).

Resultados similares foram observados por Barcellos Júnior *et al.* (2017), na avaliação realizada sete dias após a aplicação de clomazone, a variedade RB93-579 apresentou a maior intensidade de fitointoxicação mesmo para a menor dose, equivalente a 0,5 vezes a concentração recomendada de clomazone. Com a aplicação da maior dose, correspondente ao dobro da dose recomendada, a intensidade dos sintomas nas cultivares avaliadas foram semelhantes, com valores próximos a 50%. Ao longo dos períodos de avaliação houve recuperação das plantas e aos 28 DAA, para as variedades RB96-6928 e RB86-7515, os sintomas de fitointoxicação ficaram próximos a 5% na menor dose e 20% com a maior dose do herbicida. A variedade RB93-579 apresentou as maiores injúrias, com valores próximos a 30% com a aplicação da maior concentração do herbicida.

**Figura 14 - Porcentagem de fitointoxicação para quatro variedades de cana-de-açúcar submetidas a diferentes doses do herbicida clomazone aos 28 dias após aplicação (DAA)**



A partir de 1000 g i.a. ha<sup>-1</sup>, dose recomendada em bula para a cultura da cana-de-açúcar, a diferenciação das variedades quanto a sensibilidade ao clomazone se torna mais evidente, sendo que as variedades mais tolerantes apresentaram fitointoxicação ao redor de 5% enquanto as mais sensíveis apresentaram injúrias de aproximadamente 20% aos 28 DAA. Ferhatoglu, Avdiushko e Barrett (2005) avaliando o efeito de cinco concentrações de clomazone em plantas de algodão, observaram que na maior concentração de clomazone (1000 nM) houve redução de 90% nos teores de clorofila e 79% de carotenoides aos 6 dias após o tratamento. Já com a menor concentração de 1 nM, as reduções de clorofila e carotenoides foram inferiores a 20%.

Os valores máximos de fitointoxicação nas variedades mais tolerantes foram observados com a aplicação das doses de 8000 e 16000 g i.a. ha<sup>-1</sup>, que causaram injúrias de aproximadamente 28% para as duas variedades. Valores próximos a esse foram observados nas variedades sensíveis com a aplicação de 2000 g i.a. ha<sup>-1</sup>. A variedade RB93-579 foi mais afetada pela aplicação de clomazone, com valores de fitointoxicação de 41%, 48% e 58% nas doses de 4000, 8000 e 16000 g i.a. ha<sup>-1</sup>,

respectivamente. Para essas mesmas doses as injúrias observadas na variedade RB97-5201 foram de 33%, 44% e 51%, respectivamente.

Scherder, Talbert e Clark (2004) também observaram sensibilidade diferencial com a aplicação de clomazone em 14 cultivares de arroz e 4 linhagens de cultivares experimentais. Sintomas de clorose foram observados 14 dias após a emergência da cultura e variaram de 1 a 21% no primeiro ano do ensaio e de 3 a 40% no segundo ano. Maior sensibilidade ao clomazone foi observada para duas cultivares, que apresentaram recuperação mais lenta das injúrias causadas pelo herbicida. No entanto, a clorose inicial não influenciou na produtividade de nenhuma das cultivares avaliadas.

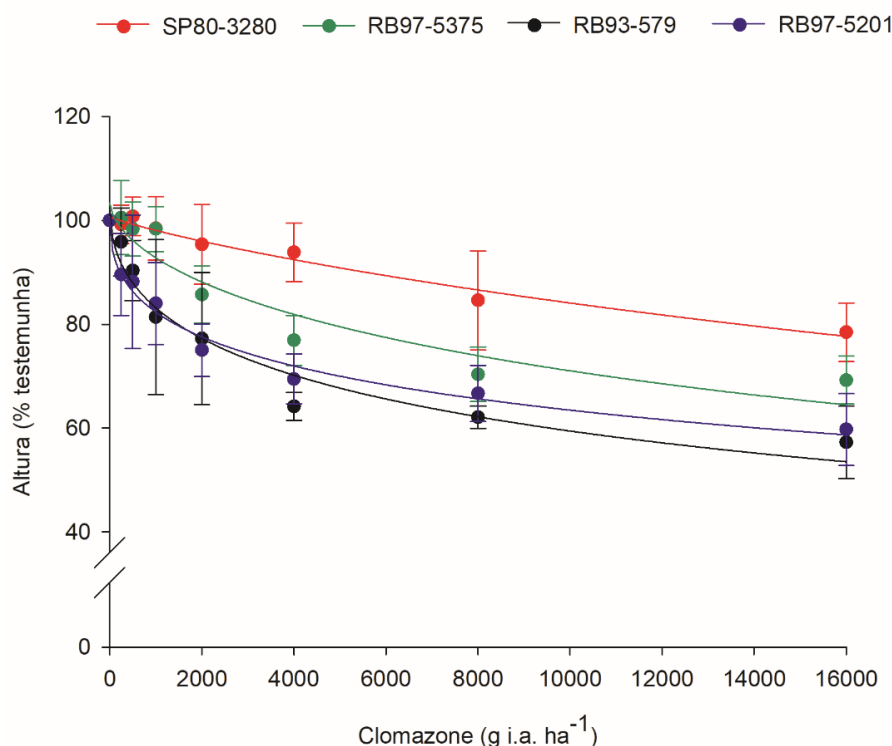
Essas características de tolerância diferencial também são evidenciadas ao observar as doses de clomazone responsáveis por causar fitointoxicação de 50% nas variedades, que foram calculadas através do ajuste do modelo de regressão linear. Para as variedades mais tolerantes SP80-3280 e RB97-5375 essas doses são de aproximadamente 4000 g i.a. ha<sup>-1</sup>, já para as variedades mais sensíveis menores doses já são suficientes para causar injúrias mais severas, com valores em torno de 2250 g i.a. ha<sup>-1</sup> para RB93-579 e 2820 g i.a. ha<sup>-1</sup> para a variedade RB97-5201 (Tabela 5).

A ação do herbicida clomazone refletiu na redução de crescimento das plantas (Figura 15), sendo que os menores efeitos foram observados para a variedade SP80-3280 mesmo nas doses mais elevadas, com redução máxima de crescimento em relação a testemunha de 21,5% na aplicação de 16000 g i.a. ha<sup>-1</sup>.

Para a variedade RB97-5375, que apresentou baixa fitointoxicação e se comportou como tolerante no Experimento 1, as reduções de altura foram maiores que as observada para SP80-3280, com valores máximos de 30% na dose mais elevada de clomazone. Já os efeitos mais prejudiciais do clomazone foram encontrados nas variedades RB93-579 e RB97-5201, apresentando as menores porcentagens de altura quando comparadas as suas respectivas testemunhas. A maior sensibilidade foi observada para a variedade RB93-579, apresentando valores de altura ligeiramente inferiores aos da variedade RB97-5201, sendo as reduções máximas de altura para essas variedades de 43% e 40%, respectivamente, na dose de 16000 g i.a. ha<sup>-1</sup> (Figura 15). As doses de clomazone responsáveis pela redução de 50% no crescimento em altura das variedades SP80-3280, RB97-5375, RB93-579

e RB97-5201 são de 65278, 37009, 19416 e 35598 g i.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 5).

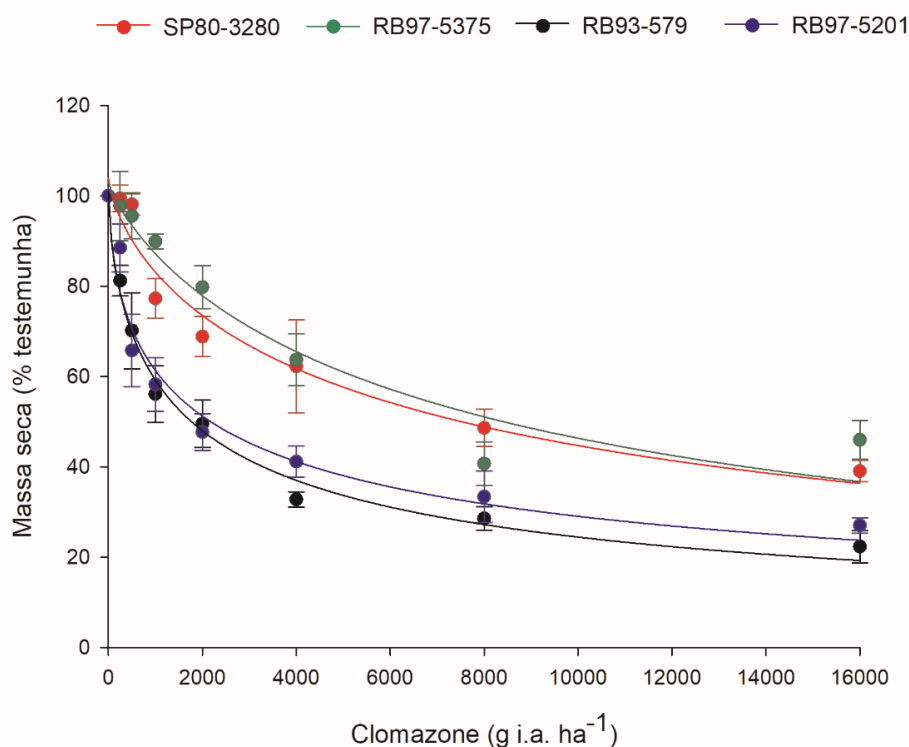
**Figura 15 - Altura de plantas (% em relação à testemunha) para quatro variedades de cana-de-açúcar submetidas a diferentes doses do herbicida clomazone aos 28 dias após aplicação (DAA)**



Perez (2017), ao avaliar a aplicação das concentrações de 270, 540, 1080, 2160 e 4320 g i.a. ha<sup>-1</sup> do herbicida clomazone em pós-emergência de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar da variedade CTC 11, observou que reduções significativas de altura em relação à testemunha ocorreram apenas na dose de 4320 g i.a. ha<sup>-1</sup> a partir de 60 dias após a aplicação do herbicida, com reduções de 57%, 37% e 24% aos 60, 90 e 120 DAA, respectivamente.

Constatou-se que a fitointoxicação das plantas e a redução do crescimento em altura, impactaram no acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas e as variedades com maiores injúrias e menor crescimento em altura, apresentaram também as menores porcentagens de massa seca quando comparadas as suas testemunhas (Figura 16).

**Figura 16 - Massa seca (% em relação à testemunha) para quatro variedades de cana-de-açúcar submetidas a diferentes doses do herbicida clomazone aos 28 dias após aplicação (DAA)**



Com a aplicação das doses de 250 e 500 g i.a. ha<sup>-1</sup>, que correspondem respectivamente a  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$  da dose recomendada de clomazone, não foi possível observar efeitos consideráveis no acúmulo de massa seca para as variedades SP80-3280 e RB97-5375, uma vez que a máxima redução desse parâmetro foi de 4,5%. Já as variedades RB93-579 e RB97-5201 comportaram-se como mais sensíveis mesmo com a aplicação das doses mais baixas do clomazone, com reduções de massa seca em relação a testemunha variando de 11% a 34% nessas concentrações do herbicida (Figura 16).

A massa seca das plantas reduziu em função do aumento da dose de clomazone, os menores valores em relação à testemunha foram observados para as variedades RB93-579 e RB97-5201, que apresentaram reduções de 78% e 73% na dose de 16000 g i.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Já para as variedades mais tolerantes a redução foi de aproximadamente 57% para essa mesma concentração (Figura 16).

A aplicação de clomazone na concentração de 1100 g i.a. ha<sup>-1</sup> em pós emergência inicial de 7 variedades SP também promoveu respostas diferenciais entre as variedades, os menores valores de massa fresca em relação a testemunha foram

observados para S87-344 com reduções de aproximadamente 43%, já a variedade SP80-3280 foi mais tolerante à ação do clomazone com redução de 6% aos 21 DAA (Ferreira *et al.*, 2010b).

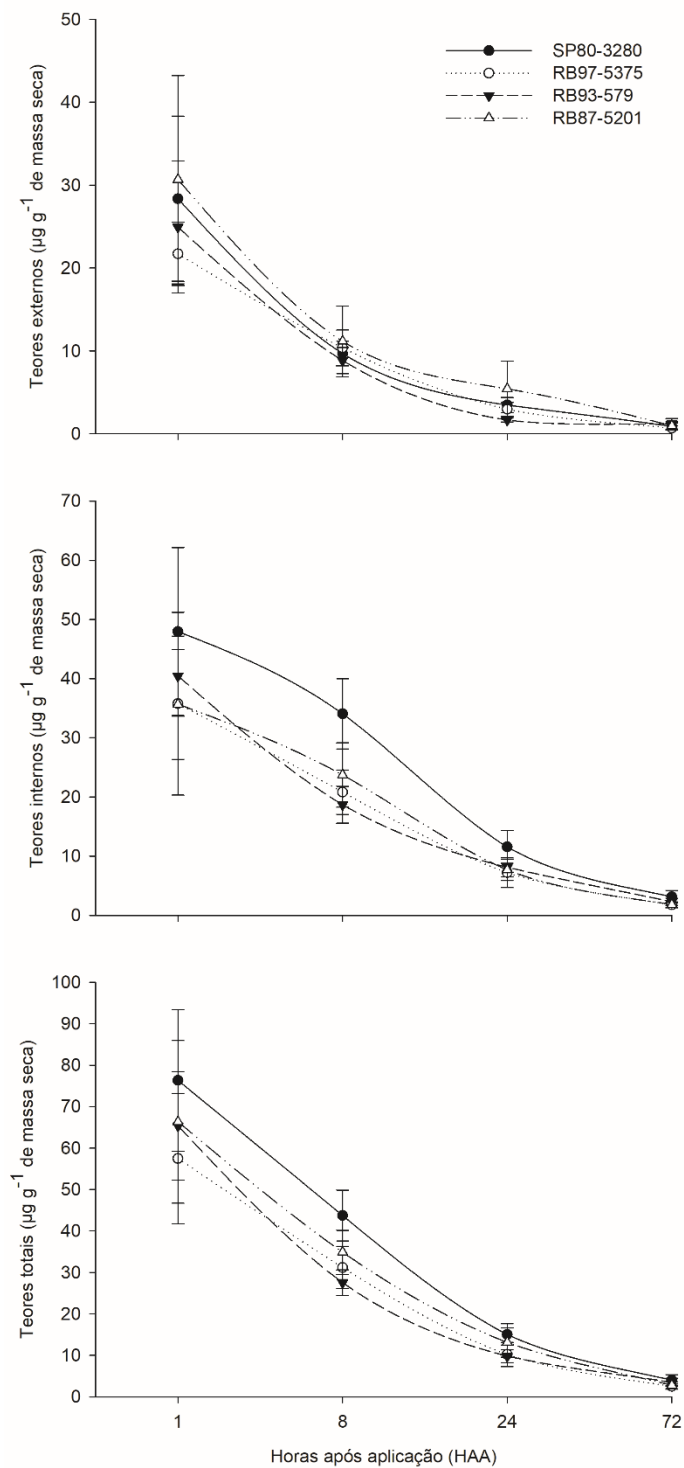
A partir da análise das doses de clomazone necessárias para causar uma redução de 50% na massa seca das plantas, também foi possível diferenciar as variedades quanto à tolerância ao herbicida, uma vez que para as variedades SP80-3280 e RB97-5375 as doses foram de 6788 e 7856 g i.a. ha<sup>-1</sup> e para as variedades RB93-579 e RB97-5201 as doses foram de 1720 e 2046 g i.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

### **4.3 Experimento 3 - Absorção e metabolização de clomazone em variedades de cana-de-açúcar**

As concentrações de clomazone foram somadas aos teores dos metabólitos hydroxyclozomazone e ketoclozomazone para a análise dos teores externos, internos e totais (Figura 17). Em relação aos teores externos, correspondentes à quantidade de herbicida não absorvido pelas plantas, pode-se observar a tendência de redução ao longo dos períodos de coleta, indicando degradação e/ou continuidade no processo de absorção pelas plantas. As características físico-químicas do herbicida e as condições edafoclimáticas são determinantes no comportamento do herbicida no ambiente, o clomazone é considerado solúvel em água (1.100 mg L<sup>-1</sup> a 25 °C) e moderadamente volátil (pressão de vapor de 1,92 x 10<sup>-2</sup> Pa a 25 °C), podendo apresentar perdas consideráveis durante e após a aplicação (Tropaldi *et al.*, 2019).

Com a coleta de 1 hora após aplicação (HAA) foi possível observar que os menores teores externos ocorreram na variedade RB97-5375 seguida por RB93-579 com valores de 21,72 e 24,94 µg g ms<sup>-1</sup>, respectivamente. Já as variedades SP80-3280 e RB97-5201 apresentaram teores levemente mais elevados, com valores de 28,36 e 30,67 µg g ms<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto, as diferenças entre as variedades quanto aos teores externos foram baixas, não havendo um padrão de resposta entre elas ao longo dos períodos de coleta (Figura 17).

**Figura 17 - Teores externos, internos e totais dos compostos ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca) para as quatro variedades de cana-de-açúcar, nos períodos de 1, 8, 24 e 72 horas após aplicação (HAA) de clomazone**



Analisando a razão entre os teores externos e os teores totais em todas as variedades e períodos de coleta, os teores externos representaram de 17 a 46% dos

teores totais. Nas médias de todos os períodos, as variedades SP80-3280, RB97-5375, RB93-579 e RB97-5201 apresentaram cerca de 26%, 32%, 30% e 38% de teores externos em relação aos teores totais dos compostos.

As maiores concentrações dos compostos no interior das plantas foram observadas para a variedade SP80-3280, essa variedade acumulou nos períodos de 1, 8, 24 e 72 HAA aproximadamente 48; 34; 11 e 3  $\mu\text{g g ms}^{-1}$ , respectivamente. A variedade RB93-579 que acumulou os menores teores externos, apresentou elevada concentração inicial dos compostos no interior da planta, com valor de 40  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca na coleta realizada 1 HAA. Após esse período, observou-se grandes reduções dos teores internos para essa variedade, com acúmulos de 19; 8 e 2  $\mu\text{g g ms}^{-1}$  para as avaliações de 8, 24 e 72 HAA. Já nas variedades RB97-5375 e RB97-5201 os teores internos assemelharam-se, com valores próximos à 35; 20; 7 e 1  $\mu\text{g g ms}^{-1}$  nas coletas de 1, 8, 24 e 72 HAA.

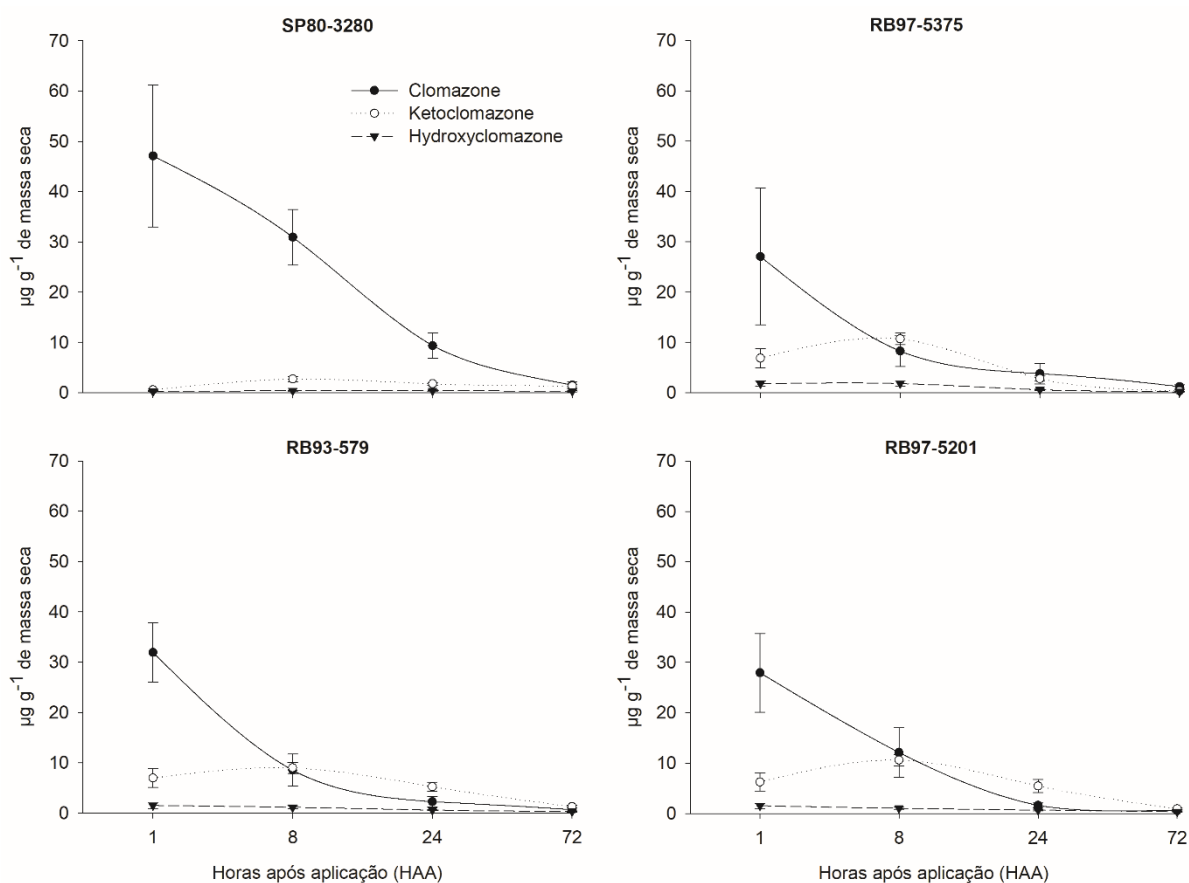
Considerando-se a soma das concentrações externas e internas dos compostos, observou-se que as variedades SP80-3280 e RB97-5201 apresentaram os maiores teores totais ao longo dos períodos de avaliação. Analisando-se a porcentagem de absorção através da razão entre o teor interno e o teor total dos compostos na coleta realizada 1 HAA, foi possível observar que todas as variedades apresentaram absorção em torno de 62%, com exceção da RB97-5201 em que a absorção foi de 54%. Uma vez que não houve padrão quanto aos valores não absorvidos e que a porcentagem de absorção entre as variedades foi similar, a tolerância diferencial não poderia ser explicada por diferenças no processo de absorção.

A sensibilidade diferencial ao clomazone pode estar relacionada à absorção diferencial, translocação, ativação ou desintoxicação (Tenbrook; Tjeerdema, 2005). Driver, Brunharo e Al-Khatib (2020), avaliando a absorção, translocação e metabolismo de clomazone em populações suscetíveis e resistentes da gramínea *Leptochola fusca* spp. *fascicularis* observaram que a absorção de clomazone apresentou leve aumento ao longo do período de avaliação de 72 horas, no entanto, os padrões de absorção entre os biótipos suscetíveis e resistentes foram semelhantes, sugerindo que a movimentação diferencial do herbicida não está associada ao mecanismo de resistência. Outros estudos também demonstram que as diferenças na sensibilidade ao clomazone observada entre espécies ou biótipos, podem não estar relacionadas à absorção diferencial do herbicida (Norman; Liebl;

Widholm, 1990; Tenbrook; Tjeerdema, 2006; Weimer; Buhler; Balke, 1991; Yasuor *et al.*, 2008).

Os dados de metabolização de clomazone estão apresentados de duas maneiras distintas. Na primeira delas é possível observar o comportamento de absorção de clomazone e sua metabolização em hydroxyclozomazone e ketoclozomazone a partir do agrupamento desses compostos para cada variedade estudada (Figura 18).

**Figura 18 - Teores internos do herbicida clomazone e dos metabólitos hydroxyclozomazone e ketoclozomazone ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca), agrupados por variedades de cana-de-açúcar, nos períodos de 1, 8, 24 e 72 horas após a aplicação (HAA) de clomazone**



O herbicida clomazone e seu metabólito hydroxyclozomazone, não inibem a síntese de isoprenóide cloroplástico ou a enzima DXP sintase na via não mevalonato do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), apenas o ketoclozomazone é responsável pela inibição da síntese de carotenoides por essa via (Ferhatoglu; Barrett, 2006). Sendo assim, para que o clomazone exerça papel fitotóxico em seu local de ação, deve ser bioativado em seu metabólito ketoclozomazone e o primeiro passo dessa conversão

catalisada por enzimas do citocromo P450 é a formação de hydroxyclozone (Nandula *et al.*, 2019).

De maneira geral, a variedade SP80-3280 apresentou comportamento muito distinto quando comparada com as demais, acumulando os maiores teores de clomazone e menores teores dos metabólitos para todos os períodos de avaliação. Observando-se o comportamento dos compostos nas demais variedades, foi possível observar maior concentração de clomazone na avaliação realizada 1 hora após a aplicação, a partir desse período as concentrações de clomazone reduzem drasticamente com valores próximos ou inferiores aos teores do metabólito ketoclozone (Figura 18).

Para a variedade SP80-3280, que se mostrou tolerante ao clomazone quando os parâmetros de crescimento foram avaliados, os teores internos de clomazone representaram aproximadamente 98%, 91%, 81% e 48% dos teores totais dos compostos no interior da planta nas coletas de 1, 8, 24 e 72 HAA, respectivamente, demonstrando baixa taxa de metabolização do herbicida. A variedade RB97-5375 que também foi menos afetada pela ação do clomazone, apresentou teores iniciais do herbicida representando 75% dos teores totais na avaliação de 1 HAA, já as 8 HAA observou-se acentuada redução na proporção de clomazone, que representou apenas 39% do teor total dos compostos, indicando elevada metabolização do clomazone neste período, no entanto, a proporção de clomazone volta a aumentar nas avaliações de 24 e 72 HAA, com valores de 53% e 68%, respectivamente.

Já as variedades que demonstraram maior sensibilidade ao clomazone, apresentaram comportamento semelhante na metabolização do herbicida, que representou 79%, 45%, 28% e 30% do teor total dos compostos na variedade RB93-579 e 78%, 61%, 21% e 31% na variedade RB97-5201 nos períodos de 1, 8, 24 e 72 HAA, respectivamente. As baixas concentrações de clomazone no interior da planta estão relacionadas com a metabolização do herbicida.

A taxa diferencial de metabolismo de herbicidas geralmente fornece a base para diferentes níveis de sensibilidade entre as espécies. As monooxigenases do citocromo P450 estão entre as principais enzimas envolvidas na seletividade de herbicidas e são responsáveis por uma ampla gama de reações de monooxigenação/hidroxilação, normalmente inserindo um átomo de oxigênio em moléculas hidrofóbicas inertes para torná-las mais reativas e hidrossolúveis (Dimaano; Iwakami, 2021).

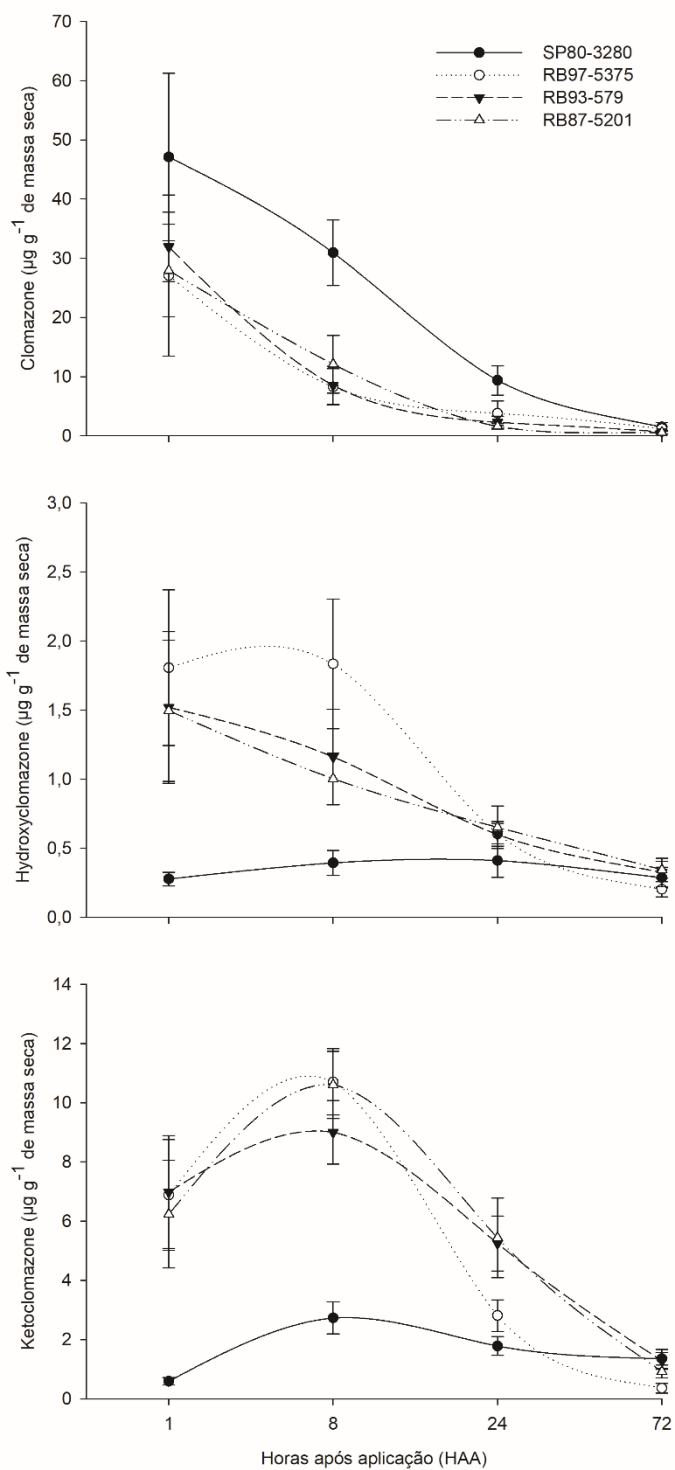
A aplicação de inibidores da desintoxicação mediada por P450 ao mesmo tempo que o herbicida clomazone reduziu as injúrias e a inibição da síntese de clorofila e carotenoides pelo herbicida em milho e algodão. Também foram observadas reduções no metabolismo de clomazone em metabólitos polares, indicando que a base da proteção de clomazone é a inibição do metabolismo tóxico do herbicida por inibidores de P450 (Ferhatoglu; Avdiushko; Barrett, 2005).

Estudos realizados por Guo *et al.* (2019), investigando se as expressões diferenciais dos genes P450, CYP81A12 e CYP81A21 estavam associadas às diferenças na suscetibilidade ao herbicida clomazone entre *Echinochloa phyllopogon* suscetível e resistente a múltiplos herbicidas, sugerem que o mecanismo de resistência ao clomazone também está relacionado à super expressão de CYP81A12 ou CYP81A21.

A segunda forma de apresentação dos dados é através do agrupamento das variedades para cada composto, analisando a diferença de comportamento entre as quatro variedades estudadas através dos teores internos de clomazone, hydroxyclozoxone e ketoclozoxone (Figura 19).

As duas variedades mais tolerantes à ação do clomazone, apresentaram comportamentos distintos na metabolização do herbicida. Analisando-se os teores internos de clomazone, foi possível observar que a variedade SP80-3280 apresentou as maiores concentrações quando comparada as demais variedades, com valores de 47,01; 30,93; 9,38 e 1,50  $\mu\text{g g ms}^{-1}$  nos períodos de 1, 8, 24 e 72 HAA, respectivamente. A bioativação de clomazone foi baixa para essa variedade, uma vez que foram observados os menores teores de hydroxyclozoxone (0,28; 0,39 e 0,41  $\mu\text{g g ms}^{-1}$ ) e ketoclozoxone (0,59; 2,73 e 1,78  $\mu\text{g g ms}^{-1}$ ) nos períodos de 1, 8 e 24 HAA, respectivamente.

**Figura 19 - Teores internos do herbicida clomazone e dos metabólitos hydroxyclozomazone e ketoclozomazone ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca), agrupados por compostos, para as quatro variedades de cana-de-açúcar nos períodos de 1, 8, 24 e 72 horas após a aplicação (HAA) de clomazone**



Menores concentrações de metabólitos do clomazone também foram observadas em plantas de arroz, consideradas tolerantes ao herbicida quando comparada à *Echinochloa oryzoides* que se mostrou suscetível à ação de clomazone. As plantas de *E. oryzoides* apresentaram concentração de 84,1% de metabólitos de clomazone, enquanto no arroz a proporção foi de 67,9%. Representando menos de 1% dos metabólitos totais para as duas espécies, a concentração de ketoclomazone foi significativamente maior em *E. oryzoides*, com teores de 21 pmol/g, enquanto no arroz os teores de clomazone ficaram em torno de 5,7 pmol/g, indicando que a espécie mais sensível metabolizou clomazone mais rapidamente ou em maior proporção do que a espécie mais tolerante (Tenbrook; Tjeerdema, 2006).

A variedade RB97-5375 que também se mostrou tolerante ao clomazone, com atenuados sintomas de injúria visual e baixas reduções nos parâmetros de desenvolvimento, apresentou baixas concentrações de clomazone quando comparada à variedade SP80-3280, estando mais próxima dos valores encontrados para as variedades mais sensíveis. Nos períodos de 1, 8, 24 e 72 HAA os teores de clomazone foram de 27,07; 8,28; 3,80 e 1,23  $\mu\text{g g ms}^{-1}$ , respectivamente. Baixas concentrações de clomazone refletiram no maior acúmulo de hydroxyclozoxime, com valores de 1,81 e 1,83  $\mu\text{g g ms}^{-1}$  e ketoclozoxime, com 6,89 e 10,70  $\mu\text{g g ms}^{-1}$  nos períodos de 1 HAA e 8 HAA, respectivamente.

Com esse comportamento em relação ao metabolismo do clomazone, esperava-se que a variedade apresentasse maior sensibilidade ao herbicida, no entanto, drásticas reduções nos teores dos compostos ocorreram no período de 24 HAA e 72 HAA, para hydroxyclozoxime os valores foram respectivamente de 0,60 e 0,20  $\mu\text{g g ms}^{-1}$ , os teores de ketoclozoxime nesses períodos já eram inferiores aos encontrados nas variedades mais sensíveis, com valores de 2,80 e 0,36  $\mu\text{g g ms}^{-1}$ , respectivamente.

Apesar da rápida conversão de clomazone nos compostos hydroxyclozoxime e ketoclozoxime, o metabolismo continuou ocorrendo ativamente na variedade RB97-5375 e em pouco tempo os teores dos metabólitos reduziram, impedindo interferências severas do herbicida no desenvolvimento das plantas. As taxas de conversão de clomazone em hydroxyclozoxime e de hydroxyclozoxime em ketoclozoxime, bem como a conversão de todos esses compostos em seus próprios metabólitos, são determinantes para indicar as concentrações e o período em que ketoclozoxime estará presente na planta (Nandula *et al.*, 2019).

A desintoxicação do clomazone através do metabolismo pode desempenhar importante papel na sensibilidade diferencial do herbicida uma vez que a toxicidade do clomazone depende do equilíbrio entre dois sistemas enzimáticos diferentes, aqueles que ativam o herbicida (principalmente através de enzimas do citocromo P450) e aqueles que o detoxificam (Tenbrook; Tjeerdema, 2005).

As variedades RB93-579 e RB97-5201, mais sensíveis à ação do clomazone, apresentaram comportamento similar no metabolismo do herbicida e acúmulo dos metabólitos. Os teores de clomazone para a variedade RB93-579 nos períodos de 1, 8, 24 e 72 HAA foram de 31,92; 8,52; 2,28 e 0,67  $\mu\text{g g ms}^{-1}$ , já na variedade RB97-5201 observou-se os teores de 27,93; 12,11; 1,59 e 0,56  $\mu\text{g g ms}^{-1}$ , respectivamente. A conversão para ketoclomazone ocorreu praticamente nas mesmas proporções para as duas variedades, sendo as médias dos valores de aproximadamente 6,6; 9,8; 5,3 e 1,1  $\mu\text{g g ms}^{-1}$  nos períodos de 1, 8, 24 e 72 HAA, respectivamente.

As concentrações de ketoclomazone nas variedades sensíveis foram elevadas quando comparadas com a variedade tolerante SP80-3280, considerando a média dos teores encontrados nas variedades RB93-579 e RB97-5201, essas variedades acumularam 11,0 vezes mais ketoclomazone do que a variedade SP80-3280 no período de 1 HAA, já nos períodos de 8 HAA e 24 HAA os teores foram 3,5 e 2,0 vezes superiores nas variedades sensíveis. Elevados teores de ketoclomazone também foram observados em estudo realizado por Driver; Brunharo e Al-Khatib (2020), em que plantas susceptíveis *Leptochloa fusca* spp. *fasicularis* acumularam duas vezes mais metabólito tóxico de ketoclomazone quando comparadas aos biótipos resistentes, evidenciando que as maiores concentrações de ketoclomazone são responsáveis pelo aumento na toxicidade da aplicação de clomazone.

Nos períodos de 1 HAA e 8 HAA os teores de ketoclomazone nas variedades sensíveis foram similares aos da variedade tolerante RB97-5375, no entanto, devido à queda dos teores nessa variedade tolerante nas avaliações subsequentes, a concentração de ketoclomazone para as variedades sensíveis RB93-579 e RB97-5201 permaneceu elevada e com teores 1,9 e 3,0 vezes superiores aos encontrados na variedade RB97-5375 nos períodos de 24 HAA e 72 HAA, respectivamente, resultando em injúrias que levaram a acentuadas reduções no desenvolvimento das plantas dessas variedades.

Biótipos suscetíveis e resistentes de *Echinochloa phyllopogon* também diferiram em sua capacidade de metabolizar o herbicida clomazone. As plantas resistentes apresentaram maior atividade de hidroxilação, convertendo hydroxyclozomazone preferencialmente em um derivado monohidroxilado, que foi encontrado em concentrações de 6 a 12 vezes menores nos biótipos suscetíveis. Já as plantas suscetíveis acumularam 2,5 vezes mais ketotoclozomazone do que plantas resistentes em 96 h após a aplicação do herbicida (Yasuor *et al.*, 2010).

#### 4.4 Experimento 4 - Deposição da calda de pulverização em variedades de cana-de-açúcar

Com a aplicação do traçador em quatro variedades de cana-de-açúcar, a interação entre as variedades e os períodos de aplicação foi significativa (Tabela 6).

**Tabela 6 - Análise de variância das concentrações do traçador aplicado aos 30 e 7 dias após o transplântio (DAT) de quatro variedades de cana-de-açúcar**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Variedade	3	6,8339	2,2779	5,963	0,0013
Período	1	23,7563	23,7563	62,187	0,0000
Variedade X Período	3	8,3229	2,7743	7,262	0,0003
Resíduo	56	21,3927	0,3820		
CV (%)	15,08				

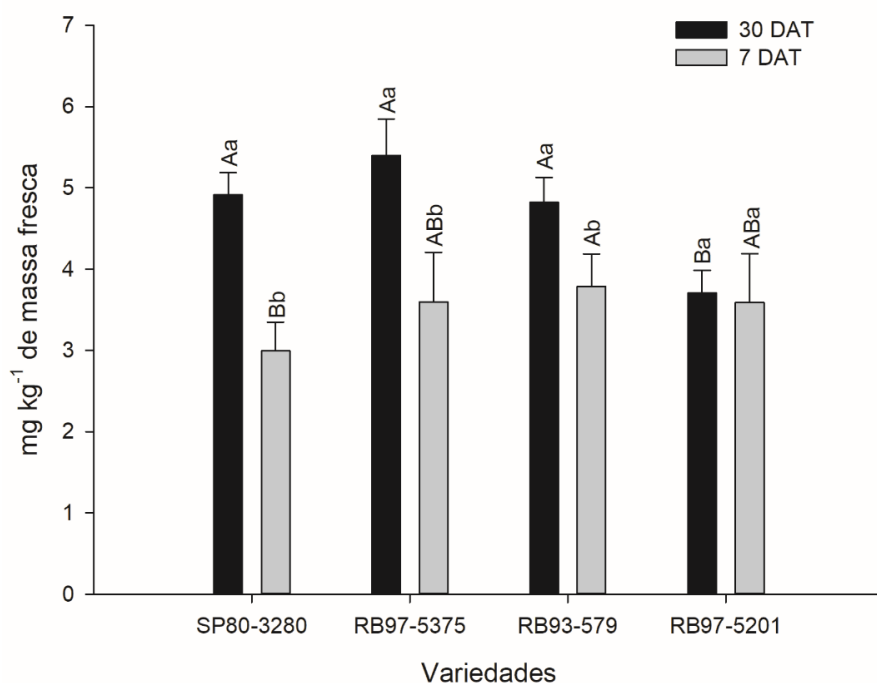
O corante Azul Brilhante não é absorvido pelas plantas, não sofre processos de degradação ou metabolização, sendo um traçador adequado para a estimativa dos teores totais depositados nas plantas. Segundo Palladini (2000), esse corante não é absorvido pelas folhas, é estável à luz solar, e mantém a solução na mesma tensão da água, permitindo a determinação qualitativa e quantitativa dos depósitos resultantes de pulverizações.

Analisando-se a deposição do traçador nas quatro variedades de cana-de-açúcar, observou-se que não houve diferença no total depositado entre as variedades RB97-5375, RB93-579 e RB97-5201, que apresentaram valores próximos a 3,6 mg kg mf<sup>-1</sup> quando a aplicação foi realizada aos 7 DAT. Para esse mesmo período, a variedade SP80-3280 apresentou as menores concentrações de deposição do

traçador (2,9 mg kg<sup>-1</sup>), diferindo-se significativamente da variedade RB93-579 (Figura 20).

A morfologia da superfície foliar pode influenciar a deposição, a distribuição e a retenção do herbicida. Existe uma grande diversidade na morfologia foliar entre diversas espécies de plantas e as características da folha como, grau e tipo de desenvolvimento da cera epicuticular, presença de tricomas e glândulas, influenciam a deposição de herbicidas nas superfícies foliares (Hess; Falk, 1990). Ferreira *et al.* (2007), avaliando as características anatômicas das folhas de variedades de cana-de-açúcar com tolerância diferencial à trifloxysulfuron-sodium + ametryn, observaram que a variedade mais sensível apresentou maior densidade de estômatos e comprimento de ostíolos e maior densidade de tricomas, fatores que poderiam explicar a maior sensibilidade dessa variedade.

**Figura 20 - Deposição do traçador corante Azul Brilhante (mg kg<sup>-1</sup> de massa fresca) aplicado aos 30 e 7 dias após o transplântio (DAT) de quatro variedades de cana de-açúcar**



- Letras maiúsculas iguais não diferem entre as variedades dentro de cada período de aplicação e letras minúsculas iguais não diferem entre os períodos de aplicação dentro de cada variedade pelo t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ).

A aplicação realizada 7 dias após o transplântio, corresponde ao mesmo período em que foram realizadas as aplicações nos Experimentos 1, 2 e 3. A variedade SP80-3280 que comportou-se como tolerante à ação do clomazone, apresentou neste estudo os menores teores depositados do traçador, já para a variedade RB93-579, mais sensível ao herbicida, os maiores teores do traçador foram observados. No entanto, a tolerância de RB97-5375 e sensibilidade de RB97-5201 não poderiam estar relacionadas com diferenças na deposição, uma vez que essas variedades não diferiram significativamente.

As diferenças nos teores depositados nas variedades SP80-3280 e RB93-579 reforçam o processo de metabolização diferencial observado entre essas variedades, pois apesar de apresentar os menores teores depositados nesse estudo, SP80-3280 também acumulou os maiores teores totais dos compostos (Experimento 3), com maiores porcentagens de clomazone em relação ao teor total, indicando menor metabolização dos compostos durante os períodos avaliados. Já os teores totais na variedade RB93-579 foram baixos quando comparado a SP80-3280, o que poderia indicar menor deposição para essa variedade, se contrapondo aos resultados de maior deposição do traçador. Esse fato indica que os menores teores internos ocorreram devido a rápida metabolização do herbicida e dos metabólitos em compostos que não foram quantificados.

Quando a aplicação do traçador foi realizada 30 dias após o transplântio das mudas, não houve diferença entre SP80-3280, RB97-5375 e RB93-579, apenas a variedade RB97-5201 apresentou a menor concentração depositada, diferindo significativamente das demais. Para essa variedade, não houve diferença entre os teores depositados independente do período de aplicação. Já para as demais variedades, foi observado maior deposição do traçador quando a aplicação foi realizada aos 30 DAT. As concentrações do corante depositadas nas variedades SP80-3280, RB97-5375 e RB97-5201 aos 30 DAT foram 1,6; 1,5 e 1,3 vezes maiores do que os valores encontrados na aplicação realizada aos 7 DAT, respectivamente (Figura 20).

Os resultados de deposição do herbicida clomazone e do traçador nas quatro variedades de cana-de-açúcar, permitiram o ajuste de modelos de regressão não-linear de Gompertz, uma vez que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) se manteve acima de 0,99 para períodos avaliados. As estimativas dos parâmetros e os valores de média, moda e mediana estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7 - Estimativas dos parâmetros e dos valores de média, moda e mediana dos modelos de Gompertz ajustados para os dados de deposição do traçador e do clomazone aplicados aos 30 e 7 dias após o transplante de quatro variedades de cana-de-açúcar**

Parâmetros	Clomazone (ng cm <sup>-2</sup> )		Traçador (µL cm <sup>-2</sup> )	
	30 DAT	7 DAT	30 DAT	7 DAT
a	4,60517	4,60517	4,60517	4,60517
b	-10,4761	-6,2518	-10,4758	-6,2518
c	0,0133	0,00834	66,3175	41,6866
Média	822,38	822,87	0,17	0,16
Moda	787,68	749,62	0,16	0,15
Mediana	815,24	793,57	0,16	0,16
F	4147,68**	4803,63**	4148,08**	4803,61**
R <sup>2</sup>	0,9964	0,9969	0,9964	0,9969

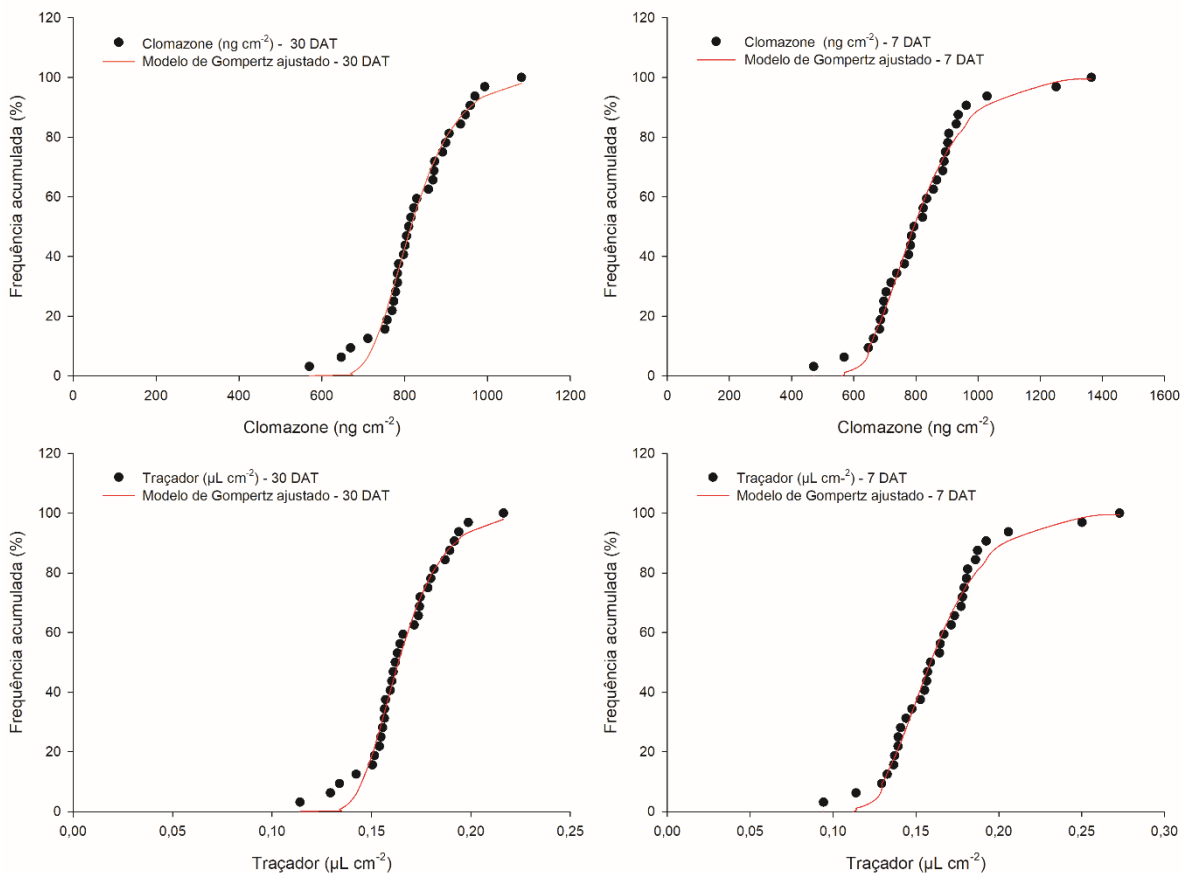
\*\*Significativo pelo teste de F, à  $p \leq 0,01$ .

As concentrações do traçador e do clomazone foram ajustadas por unidade de área (cm<sup>-2</sup>). Analisando os valores de clomazone (ng cm<sup>-2</sup>) e do traçador (µL cm<sup>-2</sup>), pode-se observar o mesmo padrão das curvas tanto no período de 30 DAT quanto aos 7 DAT, indicando que o traçador correspondeu ao comportamento de deposição do herbicida (Figura 21).

Analisando-se a frequência acumulada, observou-se a maior variação dos depósitos de calda com a aplicação realizada aos 7 DAT. A concavidade da curva mostra a uniformidade da deposição, quanto mais plana a curva maior é a frequência dos valores extremos, ou seja, maiores diferenças entre os maiores e menores volumes depositados nas plantas (Velini, 1995). Além de representar os maiores valores de deposição nas variedades de cana-de-açúcar, menor desuniformidade dos depósitos ocorreu quando a aplicação foi realizada 30 dias após o transplante das mudas.

Os resultados dessa pesquisa contrapõem-se aos relatados por Souza; Velini e Palladini (2007), que ao comparar o padrão de deposição em três estágios de desenvolvimento da cultura da soja, observaram decréscimo de depósitos por unidade de área com o aumento da área foliar das plantas. Os autores correlacionam esse comportamento com o maior acúmulo e sobreposição de folhas, indicando que o crescimento e desenvolvimento da cultura pode representar um fator de aumento de seletividade, uma vez que menores concentrações do ingrediente ativo serão depositadas.

**Figura 21 - Frequência acumulada de depósitos do traçador corante Azul Brillhante ( $\mu\text{L cm}^{-2}$ ) e do herbicida clomazone ( $\text{ng cm}^{-2}$ ) aplicados aos 30 e 7 dias após o transplântio (DAT) de quatro variedades de cana-de-açúcar**



De maneira geral, os dados demonstram que quando a aplicação é realizada aos 7 DAT, as taxas totais de deposição são menores, as diferenças entre as variedades quanto ao teor depositado são maiores e maior a variabilidade das concentrações depositadas nas plantas. Todas essas características podem influenciar no comportamento das variedades quanto a tolerância ao herbicida, uma vez que interferem diretamente na quantidade de produto que estará disponível para a absorção pelas plantas.

## 5 CONCLUSÕES

As variedades de cana-de-açúcar plantadas no sistema MPB apresentaram tolerância diferencial ao herbicida clomazone. As variedades SP80-3280 e RB97-5375 comportaram-se como mais tolerantes à ação do herbicida, enquanto as variedades RB93-579 e RB97-5201 foram mais sensíveis, apresentando as maiores reduções dos parâmetros avaliados.

Não houve diferenças expressivas na absorção do herbicida entre as variedades. A variedade SP80-3280 apresentou as menores conversões de clomazone no metabólito ativo ketoclomazone, a variedade RB97-5375 apresentou elevado acúmulo inicial de ketoclomazone, no entanto, as concentrações reduziram drasticamente nas últimas coletas. Já nas variedades sensíveis, houve rápida metabolização de clomazone em ketoclomazone, que permaneceu em concentrações mais elevadas até a coleta de 72 HAA.

Diferenças na deposição foram observadas entre as variedades e os períodos de aplicação, no entanto, não foi possível estabelecer um padrão entre a sensibilidade e a deposição para todas as variedades.

A tolerância diferencial ao herbicida clomazone nas variedades estudadas de cana-de-açúcar está relacionada com o metabolismo diferencial do herbicida.



## REFERÊNCIAS

- ABIT, M. J. M.; AL-KHATIB, K. Absorption, translocation, and metabolism of mesotrione in grain sorghum. **Weed Science**, v. 57, n. 6, p. 563–566, 2009.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>.
- AMBROSANO, E. J. et al. Utilization of nitrogen from green manure and mineral fertilizer by sugarcane. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 6, p. 534–542, 2005.
- ARALDI, R. et al. Chlorophyll fluorescence in guanandi tree (*Calophyllum brasiliense*) after herbicide application. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 77–82, 2015.
- ARANTES, M. T. et al. Respostas fisiológicas de cultivares de cana-de-açúcar a herbicidas seletivos. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, p. 1206–1214, 2013.
- AREVALO, R. Invasoras na cana cana. **Cultivar**, p. 21–23, 2002.
- AZANIA, A. A. P. M. et al. Interferência da palha de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) na emergência de espécies de plantas daninhas da família Convolvulaceae. **Planta Daninha**, v. 20, n. 2, p. 207–212, 2002.
- AZANIA, C. A. M.; AZANIA, A. A. P. M. Seletividade de herbicidas. In: MONQUERO, P. A. (Ed.). **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. São Carlos: RiMa Editora, 2014. p. 217–234.
- BARBOSA, V. F. A. DE M. Plantio. In: SANTOS, F.; BORÉM, A. (Eds.). **Cana-de-açúcar do plantio a colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2016. p. 29–65.
- BARCELLOS JÚNIOR, L. H. et al. Differential tolerance of sugarcane cultivars to clomazone. **Planta Daninha**, v. 35, p. 1–8, 2017.
- BARTHOLOMEW, D. M. et al. Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. **Plant Physiology**, v. 130, n. 3, p. 1562–1572, 2002.
- CARBONARI, C. A. et al. Efeitos de períodos de permanência de clomazone + hexazinona no solo e na palha de cana-de-açúcar antes da ocorrência de chuvas na eficiência de controle de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p. 197–205, 2010.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. **Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar: novas moléculas herbicidas**.
- COBB, A. H.; READE, J. P. H. Herbicide selectivity and metabolism. In: COBB, A. H.; READE, J. P. H. (Eds.). **Herbicides and plant physiology**. 2. ed. Newport: Wiley-Blackwell, 2011. p. 70–86.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - (CONAB). Acompanhamento da

Safra Brasileira - Cana-de-açúcar. v. 9, n. 3, p. 1–58, 2022.

CORREIA, N. M.; DURIGAN, J. C. Emergência de plantas daninhas em solo coberto com palha de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 22, n. 1, p. 11–17, 2004.

CULPEPPER, A. S. et al. Effect of insecticides on clomazone absorption, translocation and metabolism in cotton. **Weed Science**, v. 49, n. 5, p. 613–616, 2001.

DANKOV, K. et al. Relationship between the degree of carotenoid depletion and function of the photosynthetic apparatus. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 49–56, 2009.

DAYAN, F. E.; ZACCARO, M. L. DE M. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 3, p. 189–197, 2012.

DIAS, J. L. C. DE S. et al. Herbicides selectivity in pre-budded seedlings of sugarcane. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, p. 1–9, 2017.

DIMAANO, N. G.; IWAKAMI, S. Cytochrome P450-mediated herbicide metabolism in plants: current understanding and prospects. **Pest Management Science**, v. 77, n. 1, p. 22–32, 2021.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. DE; LANDELL, M. G. DE A. **Cana-de-açúcar**. 1ª ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 2010.

DRIVER, K. E.; BRUNHARO, C. A. C. G.; AL-KHATIB, K. Mechanism of clomazone resistance in *Leptochloa fusca* spp. *fascicularis* to clomazone. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 162, n. June 2019, p. 1–5, 2020.

ELNAGGAR, S. F. et al. Metabolism of Clomazone Herbicide in Soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 880–883, 1992.

FERHATOGLU, Y.; AVDIUSHKO, S.; BARRETT, M. The basis for the safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 81, n. 1, p. 59–70, 2005.

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

FERREIRA, E. A. et al. Leaf blade quantitative anatomy of sugarcane cultivars and clones. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 25–34, 2007.

FERREIRA, E. A. et al. Manejo de plantas daninhas em cana-crua. **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 915–925, 2010a.

FERREIRA, E. A. et al. Toxicidade de herbicidas a genótipos de cana-de-açúcar. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 1, p. 84–92, 2012.

FERREIRA, R. R. et al. Tolerância diferencial de variedades de cana-de-açúcar a estresse por herbicidas. **Bragantia**, v. 69, p. 395–404, 2010b.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agrônômico no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. DE; LANDELL, M. G. DE A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010. p. 31–44.

GALON, L. et al. Tolerância de novos genótipos de cana-de-açúcar a herbicidas. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 329–338, 2010.

GALON, L. et al. Interferência de *Brachiaria brizantha* nas características morfológicas da cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1029–1036, 2011.

GUO, F. et al. Role of CYP81A cytochrome P450s in clomazone metabolism in *Echinochloa phyllopogon*. **Plant Science**, v. 283, n. February, p. 321–328, 2019.

HARTLEY, H. The use of range in analysis of variance. **Biometrika**, v. 37, p. 271–280, 1950.

HATZIOS, K. K. Biotransformations of herbicides in higher plants. In: GROVER, R.; CESSNA, A. J. (Eds.). **Environmental Chemistry of Herbicides**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991. p. 141–185.

HESS, F. D. Chapter Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerances and susceptibility. In: DUKE, S. O. (Ed.). **Herbicide Physiology**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985. p. 191–214.

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

HESS, F. D.; FALK, R. H. Herbicide deposition on leaf surfaces. **Weed Science**, v. 38, p. 280–288, 1990.

JADOSKI, C. J. et al. Physiology development in the vegetative stage of sugarcane. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 3, n. 2, p. 177–185, 2010.

KANA, R. et al. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 78, p. 161–170, 2004.

KUVA, M. A. et al. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. I - tiririca. **Planta Daninha**, v. 18, n. 2, p. 241–251, 2000.

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

KUVA, M. A.; SALGADO, T. P. Manejo de plantas daninhas da cultura da cana-de-açúcar. In: MONQUERO, P. A. (Ed.). **Manejo de plantas daninhas nas culturas**

**agrícolas.** São Carlos: RiMa Editora, 2014. p. 82–112.

LANDELL, M. G. DE A. et al. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas.** (Documento ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2012.

LICHTENTHALER, H. K. et al. The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. **Z Naturforsch C J Biosci.**, v. 55, p. 305–313, 2000.

MARGARIDO, F. B.; SANTOS, F. Planejamento da lavoura. In: SANTOS, F.; BORÉM, A. (Eds.). **Cana-de-açúcar do plantio a colheita.** Viçosa, MG: Ed. UFV, 2016. p. 1–28.

MARTINS, D. et al. Seletividade de herbicidas em variedades de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 28, p. 1125–1134, 2010.

MATSUE, Y. et al. The herbicide ketoclozazole inhibits 1-deoxy- D -xylulose 5-phosphate synthase in the 2- C -methyl- D -erythritol 4-phosphate pathway and shows antibacterial activity against *Haemophilus influenzae*. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 10, p. 583–588, 2010.

MEIRELLES, G. L. S.; ALVES, P. L. C. A.; NEPOMUCENO, M. P. Determinação dos períodos de convivência da cana-de-açúcar com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 67–73, 2009.

MONQUERO, P. A.; HIRATA, A. C. S. Comportamento de herbicidas nas plantas. In: MONQUERO, P. A. (Ed.). **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas.** São Carlos: RiMa Editora, 2014. p. 145–166.

MUELLER, C. et al. Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 792–793, 2000.

NANDULA, V. K. et al. Herbicide metabolism: crop selectivity, bioactivation, weed resistance, and regulation. **Weed Science**, v. 67, n. 2, p. 149–175, 2019.

NEGRISOLI, E. et al. Seletividade de herbicidas aplicados em pré-emergência na cultura de cana-de-açúcar tratada com nematicidas. **Planta Daninha**, v. 22, n. 4, p. 567–575, 2004.

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

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

OLIVEIRA JR., R. S. DE. Mecanismos de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA JR., R.

S. DE; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Eds.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba, PR: Ompipax, 2011. p. 141–192.

OLIVEIRA JR., R. S.; INOUE, M. H. Seletividade de herbicidas para culturas e plantas daninhas. In: OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Eds.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba, PR: Ompipax, 2011. p. 243–262.

PALLADINI, L. A. **Metodologia para avaliação da deposição em pulverizações**. 2000. 111 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

PEREZ, L. L. **Seletividade de sulfentrazone e clomazone aplicados em pré-plantio de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar CTC 11**. 2017. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências/Fitotecnia) – USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2017.

PITELLI, R. A. Competição entre plantas daninhas e plantas cultivadas. In: MONQUERO, P. A. (Ed.). **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. São Carlos: RiMa Editora, 2014. p. 61–82.

PROCÓPIO, S. DE O. et al. Plantas daninhas. In: SANTOS, F.; BORÉM, A. (Eds.). **Cana-de-açúcar do plantio a colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2016. p. 139–176.

PROCÓPIO, S. DE O.; SILVA, A. AL.; VARGAS, L. Manejo e controle de plantas daninhas em cana-de-açúcar. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. (Eds.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. p. 477–532.

QUEIROGA, C. L. Analisadores de massa: QTRAP. In: **Espectrometria de massas: princípios e aplicações**. Disponível em: Acesso em: 23 jan. 2023

READE, J. P. H.; MILNER, L. J.; COBB, A. H. A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. **Weed Science**, v. 52, n. 3, p. 468–474, 2004.

RICHARD JR, E. P. Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) Tolerance to Clomazone. **Weed Technology**, v. 10, n. 1, p. 90–94, 1996.

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Instituto de Biociências, Unesp, 1995.

SABBAG, R. DOS S. et al. Crescimento inicial de mudas pré brotadas de cana-de-açúcar submetidas a aplicação de herbicidas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 16, n. 1, p. 38–49, 2017.

SANDMANN, G. Bleaching herbicides: action mechanism in carotenoid biosynthesis, structural requirements and engineering of resistance. In: BOGER, P.; WAKABAYASHI, K.; HIRAI, K. (Eds.). **Herbicide classes in development: mode of action, targets, genetic engineering, chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2002. p. 43–58.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. DE. Anatomia e Botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. DE; LANDELL, M. G. DE A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2010. p. 45–56.

SCHERDER, E. F.; TALBERT, R. E.; CLARK, S. D. Rice (*Oryza sativa*) cultivar tolerance to clomazone. **Weed Technology**, v. 18, n. 1, p. 140–144, 2004.

SENSEMAN, S. A. **Herbicide handbook**. 9. ed. Champaign: Weed Science Society of America, 2007.

SHIMABUKURO, R. H.; LAMOUREUX, G. L.; FREAR, D. S. Pesticide metabolism in plants reactions and mechanisms. In: MATSUMURA, F.; MURTI, C. R. K. (Eds.). **Biodegradation of pesticides**. New York: Plenum Press, 1982. v. 21p. 21–66.

SILVA, G. S. et al. Manejo de plantas daninhas no sistema de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 86–94, 2018.

SILVA, P. V.; MONQUERO, P. A. Influência da palha no controle químico de plantas daninhas no sistema de cana crua. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 1, p. 94–103, 2013.

SIMINSZKY, B. Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. **Phytochem Rev**, v. 5, p. 445–458, 2006.

SOBRINHO, O. P. L. et al. A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e o manejo da irrigação. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 4, p. 1605–1625, 2019.

SOUZA, R. T.; VELINI, E. D.; PALLADINI, L. A. Aspectos metodológicos para análise de depósitos de pulverizações pela determinação dos depósitos pontuais. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 195–202, 2007.

SPONSEL, V. M. The deoxyxylulose phosphate pathway for the biosynthesis of plastidic isoprenoids: early days in our understanding of the early stages of gibberellin biosynthesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 332–345, 2002.

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

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

TENBROOK, P. L.; TJEERDEMA, R. S. Biotransformation of clomazone in rice (*Oryza sativa*) and early watergrass (*Echinochloa oryzoides*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, p. 38–45, 2006.

TROPALDI, L. et al. Dynamics of clomazone formulations under different applications conditions. **Planta Daninha**, v. 37, p. 1–10, 2019.

USUI, K. Metabolism and selectivity of rice herbicides in plants. **Weed Biology and Management**, v. 1, p. 137–146, 2001.

VELINI, E. D. **Estudos e desenvolvimento de métodos experimentais e amostrais adaptados à matologia**. 1995. 250f. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

VELINI, E. D. et al. Avaliação da seletividade da mistura de oxyfluorfen e ametryne, aplicada em pré ou pós-emergência, a dez variedades de cana-de-açúcar (cana-planta). **Planta Daninha**, v. 18, n. 1, p. 123–134, 2000.

VICTÓRIA FILHO, R.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Manejo de plantas daninhas e produtividade da cana. **Visão Agrícola**, n. 1, p. 32–37, 2004.

WANG, C. J.; LIU, Z. Q. Foliar uptake of pesticides - Present status and future challenge. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 1, p. 1–8, 2007.

WEIMER, M. R.; BUHLER, D. D.; BALKE, N. E. Clomazone selectivity: absence of differential uptake, translocation, or detoxication. **Weed Science**, v. 39, n. 4, p. 529–534, 1991.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends Plant Sci.**, v. 5, n. 3, p. 116–123, 2000.

YASUOR, H. et al. Responses to clomazone and 5-ketoclomazone by *Echinochloa phyllopogon* resistant to multiple herbicides in Californian rice fields. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1031–1039, 2008.

YASUOR, H. et al. Differential oxidative metabolism and 5-ketoclomazone accumulation are involved in *Echinochloa phyllopogon* resistance to clomazone. **Plant Physiology**, v. 153, n. 1, p. 319–326, 2010.

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

ZANGOUEINEJAD, R.; ALEBRAHIM, M. T.; TSENG, T. M. Absorption and translocation of dicamba in dicamba-tolerant wild tomato. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 101, n. 1, p. 30–38, 2021.

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

ZERA, F. S.; SCHIAVETTO, A. N. A. R.; AZANIA, C. A. M. Interferência de plantas daninhas em mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar nas tecnologias Plene PB, Plene Evolve e MPB. **Revista STAB**, v. 34, n. 5, p. 39–42, 2016.

**APÊNDICE A - Análise da homogeneidade das variâncias residuais (Fmáximo) entre os experimentos realizados em duplicata para as variáveis altura, número de folhas, número de perfilhos, taxa de transporte de elétrons (ETR) e eficiência fotoquímica Fotossistema II ( $\phi$ PSII) aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) e massa seca aos 28 DAA do clomazone**

Experimento	QMe			
	7 DAA	14 DAA	21 DAA	28 DAA
<b>Altura</b>				
1	526,8674	553,6914	485,1110	393,2300
2	90,8099	490,6895	181,6219	121,5203
<b>Fmáximo</b>	5,8019	1,1284	2,6710	3,2359
<b>Número de folha</b>				
1	601,7657	745,4010	344,4643	1331,7802
2	570,8321	151,4244	390,5032	868,9798
<b>Fmáximo</b>	1,0542	4,9226	1,1337	1,5326
<b>Número de perfilho</b>				
1	9708,4970	6884,3896	4992,1329	932,2253
2	5555,5778	7790,8255	856,5015	1567,7609
<b>Fmáximo</b>	1,7475	1,1317	5,8285	1,6817
<b>ETR</b>				
1	2684,6410	174,6818	74,6733	132,2059
2	8164,1913	777,1815	65,9559	153,8459
<b>Fmáximo</b>	3,0411	4,4491	1,1322	1,1637
<b><math>\phi</math>PSII</b>				
1	2688,147	143,6048	258,06	96,98323
2	4383,147	776,2481	131,3477	153,7006
<b>Fmáximo</b>	1,6305	5,4054	1,9647	1,5848
<b>Massa seca</b>				
1	-	-	-	1337,5182
2	-	-	-	1531,0790
<b>Fmáximo</b>	-	-	-	1,1447

**APÊNDICE B - Análise da homogeneidade das variâncias residuais (Fmáximo) entre os experimentos realizados em duplicata para a variável fitointoxicação aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) do clomazone**

Experimento	QMe				
	3 DAA	7 DAA	14 DAA	21 DAA	28 DAA
	<b>Fitointoxicação</b>				
<b>1</b>	1204,5833	468,4667	299,8667	183,3833	43,3333
<b>2</b>	1204,5833	140,3167	164,4667	75,3333	250,9833
<b>Fmáximo</b>	1,0000	3,3386	1,8233	2,4343	5,7919

**APÊNDICE C - Análise da homogeneidade das variâncias residuais (Fmáximo) entre os experimentos realizados em duplicata para as concentrações de clomazone, keto-clomazone e hydroxi-clomazone às 1, 8, 24 e 72 horas após a aplicação (DAA) do clomazone**

Experimento	QMe			
	1 HAA	8 HAA	24 HAA	72 HAA
<b>Clomazone</b>				
1	1356,5463	655,8409	43,4295	0,5380
2	195,6029	645,2581	109,4599	2,1442
<b>Fmáximo</b>	6,9352	1,0164	2,5204	3,9854
<b>Hydroxyclozomazone</b>				
1	0,3305	0,6746	0,2068	0,0123
2	2,0849	4,3923	0,0298	0,0364
<b>Fmáximo</b>	6,3080	6,5109	6,9344	2,9603
<b>Ketoclozomazone</b>				
1	11,6427	80,4264	15,3104	0,9965
2	76,7287	64,8249	18,0780	1,1725
<b>Fmáximo</b>	6,5903	1,2407	1,1808	1,1767

**APÊNDICE D - Análise da homogeneidade das variâncias residuais (Fmáximo) entre os experimentos realizados em duplicata para os teores externos, internos e totais às 1, 8, 24 e 72 horas após a aplicação (DAA) do clomazone**

Experimento	QMe			
	1 HAA	8 HAA	24 HAA	72 HAA
<b>Teores externos</b>				
1	75,1991	5,5652	8,9422	0,1987
2	519,9110	36,2557	55,2231	1,2331
<b>Fmáximo</b>	6,9138	6,5148	6,1756	6,2075
<b>Teores internos</b>				
1	1112,2114	285,9832	32,0234	0,6896
2	162,5225	295,1772	39,0792	4,4142
<b>Fmáximo</b>	6,8434	1,0321	1,2203	6,4007
<b>Teores totais</b>				
1	913,5109	264,9753	39,6140	0,6371
2	131,0369	317,2279	75,1872	4,2378
<b>Fmáximo</b>	6,9714	1,1972	1,8980	6,6515