

EFEITOS DE HERBICIDAS NOS TEORES DE CLOROFILAS DE *Spirodela punctata*^{1,2}

DURVALINA M. M. DOS SANTOS³, ROBINSON A. PITELLI⁴ e DAVID A. BANZATTO⁵

RESUMO

Com o objetivo de verificar na planta aquática *Spirodela punctata* o efeito de diferentes concentrações (0,005; 0,05; 0,5 e 5 mgL⁻¹ de ingrediente ativo) dos herbicidas butachlor, glyphosate e propanil sobre os teores de clorofila **a**, **b** e na razão clorofila **a/b**, foram conduzidos, por sete dias completos, bioensaios em sala climatizada. Determinou-se os teores de clorofilas através de leituras espectrofotométricas nas absorvâncias A₆₄₅ e A₆₆₃ nm. Os resultados mostraram que o butachlor diminuiu o teor de

clorofila **b**, o glyphosate o teor de clorofila **a**, enquanto o propanil diminuiu os teores de clorofila **a**, **b** e a razão **a/b**, provocando a maior redução de pigmentos na espécie.

Palavras chave: Pigmentos, butachlor, propanil, glyphosate, planta aquática.

ABSTRACT

Effect of the herbicides on the chlorophyll content of *Spirodela punctata*

The aim of this study was to verify the effects of the herbicides butachlor, glyphosate and propanil on content of chlorophyll of aquatic plant *Spirodela punctata*. In order to determine the effect of different concentrations of 0.005; 0.05; 0.5 and 5 mgL⁻¹ (active ingredient) of three herbicides on the contents of chlorophyll **a**, **b** and **a/b** ratio. The bioassays were conducted, for a period of seven full days, in a climate-

controlled room. Chlorophyll content was determined by spectrophotometric absorbency readings at A₆₄₅ and A₆₆₃ nm. Butachlor reduced chlorophyll **b**, the glyphosate decrease chlorophyll **a**, while the propanil reduced chlorophyll **a**, **b** and **a/b** ratio, causing the greatest reduction of the pigments in the species.

Key words: Pigments, butachlor, propanil, glyphosate, aquatic plant.

INTRODUÇÃO

A biossíntese da clorofila e o desenvolvimento dos cloroplastos podem ser inibidos por herbicidas que interferem em estruturas dos cloroplastos maduros, conduzindo à perda deste pigmento (Wolf, 1977). Estes compostos podem, além da interferência na

síntese de clorofila, também, afetar a formação de outros pigmentos (Anderson & Robertson, 1960; Sandmann & Boger, 1987).

Os herbicidas butachlor, glyphosate e propanil são frequentemente utilizados em ambientes aquáticos visando ao controle químico de muitas espécies daninhas, destacando-se, principalmente, a utilização do butachlor e

¹ Recebido para publicação em 29/01/97 e na forma revisada em 21/09/99.

² Parte da tese do primeiro autor apresentada para obtenção do título de Doutor.

³ Prof. Assistente Dr., Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV/UNESP. Rodovia Carlos Tonanni, km 5. Jaboticabal/SP. CEP: 14870-000.

⁴ Prof. Titular, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

⁵ Prof. Adjunto, Departamento de Ciências Exatas, FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

propanil no controle de plantas daninhas em cultura de arroz irrigado (Almeida & Rodrigues, 1988).

Segundo Chen (1986) e Liu & Tsai (1986) o butachlor promove inibição nos teores de clorofila de plantas de arroz, inibindo principalmente a formação dos pigmentos clorofilianos. Randhawa & Gill (1989) constataram que em algas, o butachlor também provoca considerável decréscimo na quantidade de clorofila. Yogo & Ishizuka (1986) estudando os efeitos do propanil em arroz, verificaram que este produto provoca inibição da fotossíntese, interferindo na reação de Hill e em muitas outras etapas bioquímicas do processo fotossintético. Hofstra & Switzer (1968) e Pandey (1985) relataram que o propanil atua nas membranas dos cloroplastos, contribuindo para a fitotoxicidade. Quanto ao herbicida glyphosate, o primeiro sintoma visível de toxicidade nos vegetais, segundo Kitchen *et al.*, (1981), é a presença da clorose que pode ser o resultado da diminuição da síntese ou do aumento da degradação dos pigmentos clorofilianos.

Caracteristicamente, a planta aquática *Spirodela punctata* (G.F. W. Meyer) Thompson (Lemnaceae) possui acentuada sensibilidade para detectar diversos poluentes nos ambientes aquáticos (Wang, 1984; Landolt & Kandeler, 1987; Zirschky & Reed, 1988), tendo já sido reportado na literatura estudos sobre as alterações nos teores de clorofila de espécies de Lemnaceae tratadas com diversos herbicidas (Treichel, 1974a,b; Beaumont *et al.*, 1976; Price & Wain, 1976; Grenier & Beaumont, 1983; Mattoo *et al.*, 1983; Wejnar & Michel, 1983; Wejnar & Tais, 1983). Porém, para os herbicidas em estudo neste trabalho não foram encontradas quaisquer informações a respeito de efeitos em pigmentos de *Spirodela punctata*, exceto, relatos de Landolt & Kandeler (1987) para o

herbicida glyphosate, indicando sua toxicidade para espécies de Lemnaceae em geral.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi o de verificar os efeitos de diferentes concentrações dos herbicidas butachlor, glyphosate e propanil nos teores dos pigmentos clorofilianos de *S. punctata*, visando obter um maior conhecimento das respostas biológicas da espécie, como também, propor a utilização destes pigmentos como fator de sensibilidade da planta quando presente em ambientes aquáticos poluídos por estes herbicidas.

MATERIAL E MÉTODOS

A população original das plantas de *S. punctata* foi coletada em lagoa localizada no bairro do Sobrado, município de Rio Claro, SP. Foi efetuada a limpeza das plantas coletadas na lagoa através de lavagens com água destilada, para a remoção de detritos. Logo após, as plantas foram acondicionadas em bandejas de plástico contendo quatro a seis litros de solução nutritiva de Hutner na proporção de 1:1 (Hutner, 1953), e mantidas em sala climatizada com luminosidade de 5000 lux, fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro e, temperatura constante de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Somente após um mês de aclimação, as plantas foram utilizadas nos experimentos.

Foram utilizados herbicidas comumente empregados no controle de plantas aquáticas daninhas, a saber: butachlor⁶ (2 - cloro -2',6' - dietil -N-(butoximetil) acetanilida; solubilidade em água = 20 ppm a 20° C; classe toxicológica II, medianamente tóxico), glyphosate⁷ (N-(fosfonometil)glicina; solubilidade em água = 10000 ppm a 25° C; classe toxicológica III, pouco tóxico), e propanil⁸ (3,4-dicloropropionanilida; solubilidade na água = 225 ppm a 25° C; classe toxicológica II, medianamente tóxico), nas concentrações (tratamento) de 0 (controle); 0,005; 0,05; 0,5 e 5 mgL⁻¹.

⁶ Machete® 60%, Monsanto do Brasil Ltda.

⁷ Roundup® 48%, Monsanto do Brasil Ltda.

⁸ Stam F- 4® 48%, Rohm and Haas Brasil Ltda.

A montagem dos ensaios foi realizada utilizando-se de potes de plástico branco opaco, com 13,5 cm de diâmetro superior, 10,5 cm de diâmetro inferior e 8 cm de altura, com 300 ml de solução (solução de Hutner 1:1 mais as respectivas concentrações de herbicidas) e 2 g (massa fresca em gramas) de *Spirodela punctata*. Os bioensaios foram conduzidos em sala climatizada por sete dias completos.

Determinaram-se os teores de clorofila pelo método de Arnon (1949). Para tanto, foi utilizado 1 g de frondes frescas, as quais foram maceradas com 20 ml de acetona 80% (v/v). O volume foi medido e completado até 15 ml com acetona. Após a centrifugação, o volume do sobrenadante foi medido e anotado (volume final). O resíduo foi descartado. Com o sobrenadante obtido nos vários tratamentos estudados, procederam-se às leituras espectrofotométricas em A_{663} nm (clorofila **a**) e A_{645} nm (clorofila **b**) em espectrofotômetro Coleman Perkin-Elmer. Utilizando-se os dados das leituras espectrofotométricas, calculou-se o conteúdo de clorofila **a**, **b** e razão clorofila **a/b**, através das fórmulas descritas em Arnon (1949). Os teores de clorofila foram expressos em mg g^{-1} de massa fresca (M.F.).

A análise estatística foi realizada segundo um delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições para cada tratamento. A análise de variância foi efetuada com o teste F, utilizando-se do teste de Tukey para comparações múltiplas (Banzatto & Kronka, 1992). Para a análise dos efeitos das concentrações dos três herbicidas, efetuaram-se estudos de regressão polinomial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância referente aos quadrados médios (Q.M.) dos teores de clorofila **a** e **b** de *S. punctata*, sete dias após a aplicação dos herbicidas, evidenciaram efeitos significativos para testemunha vs fatorial apenas dos teores de clorofila **b** (0,0021*).

A seguir, foi realizado o estudo de regressão polinomial (regressão linear, R.L. e regressão quadrática, R.Q.) para cada produto e, exceto o glyphosate para clorofila **b**, os herbicidas provocaram respostas significativas ($P < 0,01$) nos teores de clorofila **a** e **b** de *Spirodela punctata*.

A Figura 1 apresenta o comportamento linear da intensa redução da clorofila **a** pelas diferentes concentrações de glyphosate e propanil. Os valores encontrados de quadrados médios (Q.M.) para regressão linear (R.L.) foi de 0,0139** e 0,1464**, respectivamente para o glyphosate e propanil. O butachlor, entretanto, evidenciou um comportamento mais heterogêneo, apresentando significância na regressão quadrática (Q.M. de 0,0174**). Esta tendência de curva mostrou que o herbicida provocou aumento no teor de clorofila **a**, principalmente, na faixa de concentrações mais baixas (0,5 a 2,5 mg L^{-1}) e, diminuição acentuada nas concentrações mais elevadas.

Para os teores de clorofila **b**, visualizado na Figura 2, verifica-se que, apenas o butachlor (Q.M. para R.L. foi de 0,0047**) e propanil (Q.M. para R.L. foi de 0,1126**) causaram intensa redução no pigmento clorofiliano. O comportamento linear das concentrações do butachlor e propanil mostra uma redução do pigmento com o aumento das concentrações.

De fato, em algas, Pandey (1985) verificou que diferentes concentrações de propanil inibia a síntese de clorofila **a**, induzindo à uma perda de outros pigmentos fotossintéticos. Estudos anteriores de Hofstra & Switzer (1968), evidenciaram que este herbicida atuava nas membranas dos cloroplastos.

Fisichella *et al.* (1984) relataram que, em folhas de espécies arbóreas, a medida que se aumentava a concentração de glyphosate ocorria significativa redução dos teores de clorofila **a** e **b**. O comportamento do glyphosate provocando diminuição linear do conteúdo de clorofila **a** em *S. punctata*, é uma provável evidência de que a entrada do produto na planta foi satisfatória e, sua ação foi principalmente sobre este pigmento (Figura 1), uma vez que não provocou quaisquer

alterações significativas nos teores de clorofila **b**. Kitchen *et al.* (1981) reportaram o efeito detrimental do glyphosate sobre a síntese de ALA (ácido d-aminolevulínico), um precursor da biossíntese da clorofila. Campbell *et al.* (1976) e Pihakaski & Pihakaski (1980) constataram que, o glyphosate danificava a ultraestrutura dos cloroplastos. Cowgill *et al.* (1989) observaram que, em espécies de *Lemna* tratadas com outro

produto, triclopyr, apresentavam redução significativa da clorofila **a**, após sete dias de experimentação, enquanto que os efeitos negativos sobre a clorofila **b** somente ocorriam após 14 dias. Como as condições metodológicas deste trabalho foram de sete dias, provavelmente, este intervalo de tempo tenha sido insuficiente para a ação do glyphosate na planta como ocorreu com o triclopyr em espécies de *Lemna*.

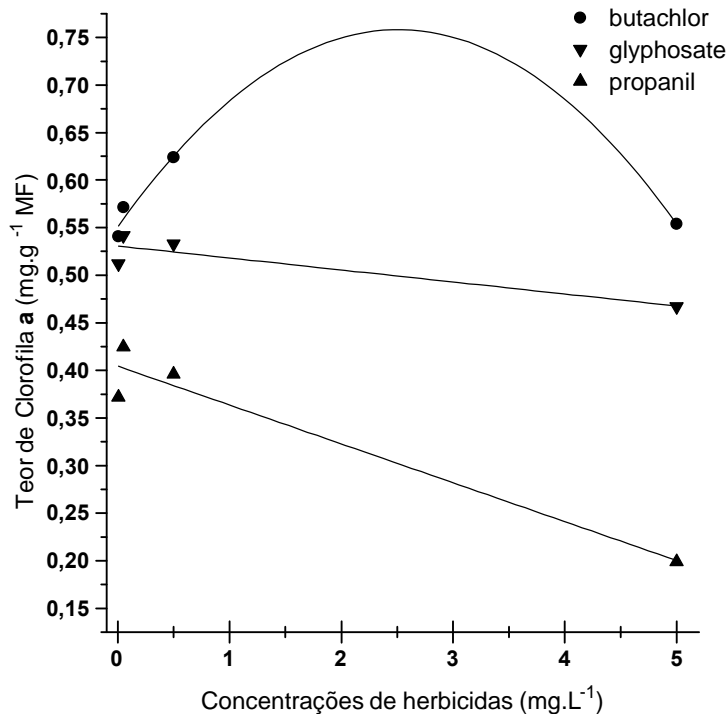


FIGURA 1. Teor de clorofila **a** de *Spirodela punctata* sob efeito dos herbicidas butachlor, glyphosate e propanil.

butachlor: $y=0,55119+0,16495x-0,03288x^2$ e $R^2=0,9298$.

glyphosate: $y=0,53076-0,01261x$ e $R^2=0,8357$.

propanil: $y=0,40443-0,04085x$ e $R^2=0,9451$.

Lockchart *et al.* (1989), entretanto, relataram que o glyphosate é tóxico para espécies de Lemnaceae, mas, salientaram que as plantas são relativamente insensíveis ao herbicida quando diluído em água, provavelmente por causa da menor disponibilidade do produto para a planta.

Wejnar *et al.* (1992) observaram que, baixas concentrações de herbicidas na água, não causam alterações nos teores de clorofila de *Lemna gibba*. Mas, Wejnar & Tais (1983) já haviam verificado que a concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ do herbicida nitrofen, em solução nutritiva, diminuía os teores

de clorofila **a** e **b** de *L. gibba*. De um modo geral, Good (1961) relatou que a clorose (diminuição acentuada de clorofila) de folhas tratadas com

herbicidas, ocorre devido a destruição da membrana dos cloroplastos e, posterior inibição da reação de Hill na fase luminosa da fotossíntese.

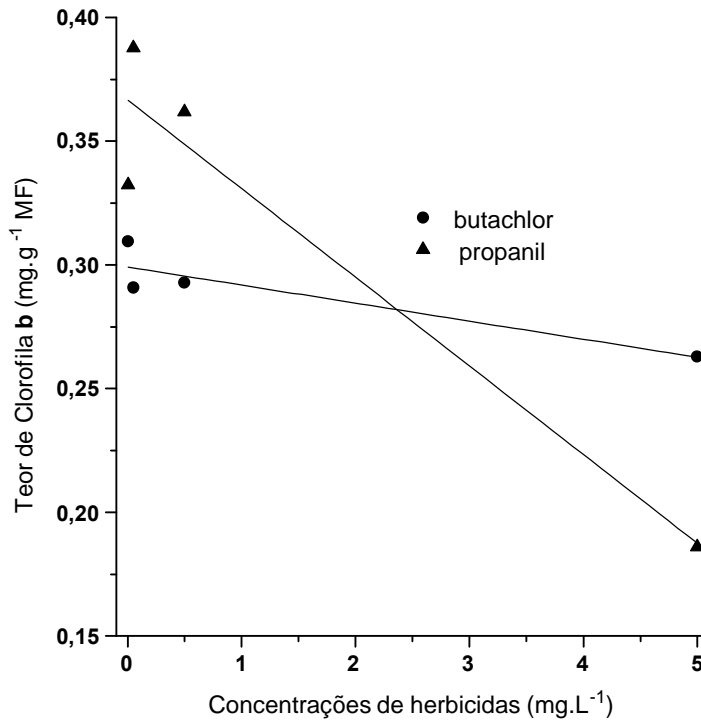


FIGURA 2. Teor de clorofila b de *Spirodela punctata* sob efeito dos herbicidas butachlor e propanil.
 butachlor: $y=0,29913-0,00729x$ e $R^2=0,8405$.
 propanil: $y=0,36666-0,03583x$ e $R^2=0,9235$.

De acordo com Randhawa & Gill (1989) o herbicida butachlor inibe a formação dos pigmentos clorofilianos em culturas de arroz e, também, causa diminuição na quantidade de clorofila em algas. Porém, na Figura 1 observa-se uma tendência de aumento da clorofila **a** pelas diferentes concentrações deste herbicida. Provavelmente, este resultado esteja relacionado com a absorção celular de nutrientes, pois, com o herbicida atrazine, Simard *et al.* (1991) relataram que, o atrazine provocava significativo aumento de clorofila em outra espécie de Lemnaceae, *Lemna minor*, em decorrência do aumento da absorção celular do cálcio e magnésio e/ou pelo

favorecimento de uma maior fixação destes elementos nas membranas dos cloroplastos.

A análise de variância e o teste de Tukey (Tabela 1) efetuados para a razão clorofila **a/b** de *S. punctata* mostrou que, independentemente das concentrações usadas, glyphosate e propanil provocaram acentuadas alterações. O efeito do propanil foi extremamente drástico na diminuição da razão clorofila **a/b**, apresentando os menores valores dentre os três herbicidas. Também, o herbicida glyphosate causou um decréscimo nos pigmentos clorofilianos, porém, somente nas concentrações mais elevadas (0,5 e 5,0 mg L⁻¹). Com relação ao butachlor não foi constatada

quaisquer alterações na razão clorofila **a/b**. Salienta-se que, a redução da razão clorofila **a/b** é uma indicação de que as folhas estão em processo de envelhecimento (Wolf, 1956; Goodwin, 1958).

Assim, a drástica diminuição da razão clorofila **a/b** pelo propanil e glyphosate podem indicar que estes herbicidas tenham intensificado a senescência nas frondes de *S. punctata*.

TABELA 1. Análise de variância e resultados do teste de Tukey referente à razão clorofila **a/b** de *Spirodela punctata*, sete dias após a aplicação de herbicidas.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios		
		Razão Clorofila a/b		
Testemunha vs Fatorial	1	0,0797 ^{ns}		
Concentrações (C)	3	0,0420 ^{ns}		
Herbicidas d. 0,005 mg L ⁻¹	2	0,9928**		
Herbicidas d. 0,05 mg L ⁻¹	2	1,5306**		
Herbicidas d. 0,5 mg L ⁻¹	2	1,5128**		
Herbicidas d. 5,0 mg L ⁻¹	2	1,3945**		
Resíduo	52	0,0213		

Concentrações (mg L ⁻¹)	Herbicidas		
	butachlor	glyphosate	propanil
0,005	1,7528 a	1,9724 a	1,1146 b
0,05	1,9710 a	2,1282 a	1,1010 b
0,5	2,1378 a	1,9124 b	1,0926 c
5,0	2,1174 a	1,8248 b	1,0922 c

ns: não significativo (P > 0,05)

** : significativo (P < 0,01)

Para cada concentração médias de herbicidas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

LITERATURA CITADA

- ALMEIDA, F.S., RODRIGUES, B.N. **Guia de herbicidas**. 2. ed., Londrina, Brasil. 1988. p. 131-136, 324-330, 445-450.
- ANDERSON, I.C., ROBERTSON, D. Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photoreduction. **Plant Physiol.**, v.35, p.531-534. 1960.
- ARNON, D.I. Cooper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol.**, v.24, n.1, p.1-15. 1949.
- BANZATTO, D.A., KRONKA, S.N. **Exp. agríc.** 2ed. Jaboticabal:FUNEP, 1992. 247 p.
- BEAUMONT, G., BASTIN, R., THERRIEN, H.P. Effets physiologiques de l'atrazine à doses sublétales sur *Lemna minor* L. 1. Influence sur la croissance, la teneur en chlorophylle, en protéine et en azote soluble et total. **Nat. Can.**, v.103, p.527-533. 1976.

- CAMPBELL, W.F., EVANS, J.O., REED, S.C. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. **Weed Sci.**, n.24, p.22-25. 1976.
- CHEN, P.C. Effects of herbicides on growth and photosynthesis of *Anabaena* CH₂ e CH₃. **Proceedings of The National Science Council Republic of China, B. Life Sciences**, v.10, n.3, p.151-156. 1986.
- COWGILL, U.M., MILAZZO, D.P., LANDENBERGER, B.D. A comparison of the effect of triclopyr triethylamine salt on two species of duckweed (*Lemna*) examined for a 7 and 14 day test period. **Water Res.**, v.23, p.617-623. 1989.
- FISICHELLA, G., TROPEA, M., SAMBUCCO, G. L'influenza del glifosato sul contenuto di clorofilla e di amminoacidi nelle foglie di alcune specie arboree. Nota II. **Tecnica Agricola.**, v.36, n.4, p.335-342. 1984.
- GOOD, N.E. Inhibitors of the Hill reaction. **Plant Physiol.**, v.36, n.6, p.788-803. 1961.
- GOODWIN, T.W. The changes in carotenoid and chlorophyll pigments in the leaves of deciduous trees during autumn necrosis. **Biochem. J.**, v.68, n.3, p.503-511. 1958.
- GRENIER, G., BEAUMONT, G. Effets physiologiques de l'atrazine á doses sublétales sur *Lemna minor*. 7. Incorporation d'acetate-1,2-(¹⁴C) dans les groupes de lipide et leurs acides gras. **Physiol. Plant.**, v.57, p.477-484. 1983.
- HOFSTRA, G., SWITZER, C.M. The phytotoxicity to propanil. **Weed Sci.**, v.16, p.23-28. 1968.
- HUTNER, S.H. Comparative physiology of heterotrophic growth. In: LOOMIS, W.E. (ed.), **Growth and differentiation in plants**. Iowa State Coll. Press. 1953. p.417-446.
- KITCHEN, L.M., WITT, W.W., RIECK, C.E. Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. **Weed Sci.**, v.29, n.4, p.513-516. 1981.
- LANDOLT, E., KANDELER, R. The family of Lemnaceae - a monographic study: phytochemistry, physiology, application, bibliography. Biosystematic investigation the family of duckweeds. **Veroffenteichungendes Geobotanischen Institutes der Eidg. Techn. Hochschule, (ETH)**. 1987. v.4, n.95, 638 p.
- LIU, A., TSAI, W.F. Effect of butachlor on rice and some paddy weeds. **J. of the Agric. Assoc. of China**, n.135, p.1-9. 1986.
- LOCKHART, W.L., BILLECK, B.N., BARON, C.L. Bioassays with a floating aquatic plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. **Hidrobiol.**, n.188/189, p.353-359. 1989.
- MATTOO, A.K., WERGIN, W.P., ST. JOHN, J.B. Adaptative reorganization of thylakoid components of *Spirodela oligorrhiza* cultured on sublethal doses of atrazine. **Plant Physiol.**, v.72, p.56, 1983. (Suplemento).
- PANDY, A.K. Effects of propanil on growth and cell constituents of *Nostoc calcicola*. **Pestic. Biochem. and Physiol.**, v.23, n.2, p.157-162. 1985.
- PIHAKASKI, S., PIHAKASKI, K. Effects of glyphosate on ultrastructure and photosynthesis of *Pellia epiphylla*. **Ann. Bot.**, v.46, p.133-141. 1980.
- PRICE, D.N., WAIN, R.L. Studies on plant growth-regulating substances. XLI.

- Structure-activity relationships and metabolism of a group of nitrophenols capable of inhibiting chloroplast development. **Ann. Appl. Biol.**, v.83, p.115-124. 1976.
- RANDHAWA, S.K., GILL, H.S. Influence of herbicides applied in transplanted rice on chlorophyll and carotenoids in wheat leaves. **J. Res.**, v.26, n.1, p.29-30. 1989.
- SANDMANN, G., BOGER, P. Herbicides affecting plant pigments. **British Crop Protection Conference Weeds. Proceedings**, v.1, p.139-148. 1987.
- SIMARD, S., PROTEAU, L., BEAUMONT, G., GRENIER, G. Increase of chloroplast granum stability, induced by sublethal concentrations of atrazine, in *Lemna minor* fronds grown on a medium partially deficient in calcium or magnesium. **Plant Physiol. Biochem.**, v.29, p. 631-638. 1991.
- TREICHEL, S. Einfluss von morphaktinen auf den stoffwechsel hoherer pflanzen. I. die wirkung auf die atmung und auf einige glykollytische enzyme. **Biochem. Physiol. Pflanzen.**, v.166, p.481-493. 1974a.
- TREICHEL, S. Einfluss von morphaktinen auf den stoffwechsel hoherer pflanzen. II. die wirkung auf die photosynthese und den gehalt an starke, ATP aun chlorophyll. **Biochem. Physiol. Pflanzen.**, v.116, p.495-509. 1974b.
- WANG, W. Uses of aquatic plants in ecotoxicology. **Environ. Internat.**, v.10, p. i-iii, 1984. (Editorial).
- WEJNAR, R., HAUSDORFER, R., SCHMIDT, M., WEISSENBORN, F. Investigations on photosynthetic pigments of Lemnaceae. 13. Comparative analysis of the bleaching effect of the herbicides amitrole, diuron and paraquat, with special consideration of NOEC. **Angew. Bot.**, v.66, p.5-6. 1992.
- WEJNAR, R., MICHEL, D. Untersuchungen zum einfluss des nitrofens auf die chloroplastenstruktur von *Lemna gibba* L. **Beitr. Biol. Pflanzen.**, v.58, p.435-441. 1983.
- WEJNAR, R., TAIS, S. Untersuchungen zum einfluss des nitrofens auf wachstum und pigmentgehalt von *Lemna gibba* L. **Beitr. Biol. Pflanzen.**, v.58, p.427-434. 1983.
- WOLF, F.T. Changes in chlorophyll *a* and *b* in autumn leaves. **Am. J. Bot.**, v.43, p.714-718. 1956.
- WOLF, F.T. Effects of chemical agents in inhibition of chlorophyll synthesis and chloroplast development in higher plants. **Bot. Ver.**, v.43, p.395-425. 1977.
- YOGO, Y., ISHIZUKA, K. Tolerance of finger millet to propanil. 3. Relationship between propanil binding by chloroplast and inhibition of photosynthetic eletron transport. **Weed Res.**, v.31, n.2, p.152-156. 1986.
- ZIRSCHKY, J., REED, S.C. The use of duckweed for wastewater treatment. **J. Water Poll. Control Fed.**, v.60, n.7, p.1253-1258, 1988.
-