

NATALIA DA CUNHA BEVILAQUA

DINÂMICA E AÇÃO DO NICOSULFURON EM HÍBRIDOS DE MILHO

Botucatu

2019

NATALIA DA CUNHA BEVILAQUA

DINÂMICA E AÇÃO DO NICOSULFURON EM HÍBRIDOS DE MILHO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas)

Orientador: Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari

Botucatu

2019

B571d

Bevilaqua, Natalia da Cunha

Dinâmica e ação do nicosulfuron em híbridos de milho / Natalia da
Cunha Bevilaqua. -- Botucatu, 2019

92 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu

Orientador: Caio Antonio Carbonari

1. Ácido aminobutírico. 2. Aminoácidos. 3. Herbicidas inibidores
da ALS. 4. Sulfonilureia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agronômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: **“DINÂMICA E AÇÃO DO NICOSULFURON EM HÍBRIDOS DE MILHO”**

AUTORA: NATALIA DA CUNHA BEVILAQUA

ORIENTADOR: CAIO ANTONIO CARBONARI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI
Produção Vegetal / FCA / UNESP - Botucatu



Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP - Câmpus de Botucatu



Dr.ª NATÁLIA CORNIANI
CABI / CABI (Centre for Agricultural Bioscience International – Centro Internacional de Biociência Agrícola)

Botucatu, 01 de março de 2019.

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

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades colocadas em meu caminho e por me dar forças e sabedoria para enfrentar os obstáculos a mim confiados;

Aos meus pais Raimundo e Gizebel por todo amor, dedicação, apoio e incentivo durante todos os momentos da minha vida e por serem responsáveis por mais essa conquista;

A toda minha família, em especial minha tia Gizene e minha avó Odília pelo carinho e por estarem sempre presentes em minha vida;

Ao Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari pela orientação, ensinamentos, paciência e oportunidades durante esses dois anos, sendo de fundamental importância para a conclusão dessa etapa;

Ao Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini pelas contribuições nessa pesquisa e por sempre compartilhar seus conhecimentos;

A Profa. Dra. Patricia Andrea Monquero pela orientação e ensinamentos durante a graduação e por ser grande incentivadora das minhas conquistas profissionais;

A Faculdade de Ciências Agrônomicas (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 partilhado durante as disciplinas cursadas;

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida;

Aos amigos e funcionários do laboratório NUPAM, José Roberto Marques Silva, José Guilherme Ferreira Cordeiro e Luis Marcelo Siono por toda a ajuda durante esses anos;

Aos amigos do NUPAM em especial, Renato Costa, Vinícius Pereira, Fábio Krenchinski e Bruno Flaibam que além dos momentos de descontração tiveram papel fundamental na condução dessa pesquisa; Ivana Ferraz e Ana Karollyna de Matos pelo apoio, paciência e valiosas contribuições; Valesca Miranda, Diego Belapart, Victor Cesco, Leandro Bianchi, Edicarlos Castro e Márcio Dias pela colaboração e ótimos momentos de convivência;

Ao meu amigo Felipe Barreto pela ajuda oferecida durante a condução dessa pesquisa e por estar sempre ao meu lado mesmo nos momentos de maior dificuldade;

As minhas amigas Gabriela Piazon, Paola Vilar, Priscila Braz, Tatianny Freitas, Amanda Zaniboni, Geovana Archangelo, Vanessa Déssia, Tatianny Soratto, Priscila Trevisoli, Taíse Brandão, Camila Gruber e Juliana Barbosa, que mesmo com a distância sempre me apoiaram nos momentos difíceis e vibraram com minhas conquistas.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma participaram dessa história.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O herbicida nicosulfuron se destaca entre os principais utilizados em pós-emergência na cultura do milho. Dentre as tecnologias disponíveis no mercado, alguns híbridos podem ser considerados tolerantes ao nicosulfuron, e essa sensibilidade diferencial está relacionada com o ambiente, o estágio de desenvolvimento da planta e a dose de herbicida utilizada. A seletividade de herbicidas é geralmente determinada em função da fitointoxicação e do efeito do produto nas características morfológicas e fisiológicas das plantas. De modo que o objetivo do trabalho foi determinar a sensibilidade de híbridos de milho ao herbicida nicosulfuron por meio de marcadores bioquímicos. O primeiro experimento foi conduzido em casa-de-vegetação com delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições em esquema fatorial 4 x 2 (híbridos x doses), o herbicida foi aplicado nas doses 0 e 120 g i.a. ha⁻¹ quando as plantas se encontravam no estágio fenológico V3. Foram realizadas avaliações da taxa de transporte de elétrons (ETR), fitointoxicação e altura aos 1, 3, 7 e 14 dias após a aplicação (DAA). Aos 14 DAA as plantas foram coletadas para determinação da massa seca. Dentre os híbridos utilizados selecionou-se o mais sensível e o mais tolerante para a realização de análises de determinação dos teores do ácido aminobutírico, e dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, nesses mesmos períodos de avaliação. O segundo experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições em esquema fatorial 8 x 2 (híbridos x doses), as doses de nicosulfuron aplicadas foram 0 e 120 g i.a. ha⁻¹. O experimento foi realizado em épocas distintas para os estádios V2 e V6 de desenvolvimento do milho. Um dia após a aplicação do herbicida as plantas foram coletadas para determinação dos teores de nicosulfuron, dos ácidos aminobutírico e quínico e dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Durante o experimento foram realizadas avaliações da taxa de transporte de elétrons aos 1, 7, 10, 14, 21 e 28 DAA; altura e fitointoxicação das plantas aos 7, 14, 21 e 28 DAA e aos 7 DAA foram determinados os teores de clorofila. As plantas foram coletadas aos 28 DAA para determinação da massa seca da parte aérea. No primeiro experimento, a coleta das plantas um dia após aplicação de nicosulfuron foi considerado o melhor período para determinação dos teores de ácido aminobutírico, uma vez que o maior acúmulo desse composto ocorreu nesse período. O híbrido mais sensível apresentou maiores valores de

fitotoxicidade, menores valores de altura, ETR, massa seca e maior acúmulo do ácido aminobutírico quando comparado ao híbrido mais tolerante. No segundo experimento os oito híbridos estudados apresentaram diferentes níveis de sensibilidade ao nicosulfuron e os maiores teores internos e externos do herbicida foram encontrados nas plantas aplicadas no estágio fenológico V2. O acúmulo de aminobutírico nas plantas após aplicação do herbicida ocorreu para todos os híbridos nos dois estádios fenológicos, no entanto só foi possível estabelecer correlações entre o acúmulo de aminobutírico e a sensibilidade dos híbridos quando a aplicação ocorreu no estágio V2 de desenvolvimento das plantas.

Palavras-chave: Ácido aminobutírico. Aminoácidos. Herbicidas inibidores da ALS. Sulfonilureia.

ABSTRACT

Nicosulfuron stands out among the principal post-emergent herbicides used in the maize crop. Among the commercial technologies available, there are some hybrids considered tolerant to this molecule and can present a differential sensitivity, process which is related to the environment, growth stage and herbicide dose. The objective of the study was to determine the sensitivity of corn hybrids to the herbicide nicosulfuron by means of biochemical markers. The first experiment was carried out under greenhouse conditions in a completely randomized design with four replications in a factorial scheme 4 x 2 (hybrids x doses). The herbicide was applied at 0 and 120 g a.i. ha⁻¹, when the plants were in the V3 stage. Electron transport rate (ETR), phytointoxication and plant height were evaluated at 1, 3, 7 and 14 days after treatment (DAT). Plants were collected at 14 DAT to determine its dry weight. The most sensitive and tolerant hybrids were selected to determinate the content of 2-aminobutyric acid and valine, leucine and isoleucine amino acids, in the same evaluation period. The second experiment was arranged in a completely randomized design with five replications in a factorial scheme 8 x 2 (hybrids x doses), the nicosulfuron was applied at 0 and 120 g a.i. ha⁻¹. The experiment was conducted in different periods, for V2 and V6 maize growing stage. One day after the herbicide application, the plants were collected to determine the content of nicosulfuron, 2-aminobutyric and quinic acid, as well as valine, leucine and isoleucine amino acids. During the experiment, the ETR was evaluated at 1, 7, 10, 14, 21 and 28 DAT, and the variables plant height and phytointoxication at 7, 14, 21 and 28 DAT. At 7 DAT the chlorophyll content was determined. Plants were collected at 28 DAT to determine the shoot dry weight. In the first experiment, the collection of the plants one day after application was considered the best period for determination of aminobutyric acid contents, since the greatest accumulation of this compound occurred during that period. The most sensitive hybrid presented higher phytotoxicity values, lower plant height, ETR, dry weight and the highest 2-aminobutyric acid accumulation when compared to the most tolerant hybrid. In the second experiment the eight hybrids presented different sensitivity levels to nicosulfuron. The greatest internal and external herbicide content was observed in V2 stage. The accumulation of 2-aminobutyric acid in the plants after herbicide application occurred for all hybrids in both growing stages, however it was only possible to establish correlations

between the accumulation of 2-aminobutyric acid and the sensitivity of the hybrids when the herbicide was applied in the V2 stage.

Keywords: 2-aminobutyric acid. Amino acids. ALS inhibitor herbicides. Sulfonilureia.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Identificação dos híbridos de milho utilizados no segundo experimento . | 34 |
| Tabela 2 – Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos | 40 |
| Tabela 3 – Massa molecular e fragmentos dos compostos analisados | 41 |
| Tabela 4 - Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , total e carotenoides em folhas de oito híbridos de milho aos 7 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V2.... | 63 |
| Tabela 5 - Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , total e carotenoides em folhas de oito híbridos de milho aos 7 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V6.... | 64 |
| Tabela 6 - Análise de variância dos teores internos, externos e totais de nicosulfuron aplicado em híbridos de milho nos estádios fenológicos V2 e V6 | 65 |
| Tabela 7 – Análise de variância dos teores do ácido aminobutírico, valina, leucina+isoleucina e ácido quínico em híbridos de milho após aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V2..... | 68 |
| Tabela 8 – Análise de variância dos teores de ácido aminobutírico, valina, leucina+isoleucina e ácido quínico em híbridos de milho após aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V6..... | 74 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Aplicação de nicosulfuron em dois estádios de desenvolvimento do milho: V2 (A) e V6 (B)..... | 35 |
| Figura 2 - Temperaturas máxima, média e mínima durante a condução dos experimentos. Estádio fenológico V2 (A) e V6 (B) | 36 |
| Figura 3 – Procedimentos para determinação dos teores de clorofila e carotenoides. Maceração das amostras (A), pesagem (B), adição da solução extratora (C,D), centrifugação (E) e leitura no espectrofotômetro (F, G, H)..... | 37 |
| Figura 4 – Procedimentos para determinação do teor interno dos compostos. Maceração (A), liofilização (B), pesagem (C), preparo e adição de água acidificada (D, E), sonicação (F), centrifugação (G) e filtragem (H, I) das amostras..... | 39 |
| Figura 5 - Cromatógrafo líquido (Prominence UFLC) acoplado ao espectrômetro de massas (Triple Quad 4500, AB Sciex). | 40 |
| Figura 6 – Cromatograma obtido para o nicosulfuron ($37,5 \text{ ng ml}^{-1}$) | 42 |
| Figura 7 – Cromatograma obtido para o ácido aminobutírico (A), ácido quínico (B), valina (C) e leucina+isoleucina (D) ($37,5 \text{ ng ml}^{-1}$)..... | 42 |
| Figura 8 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 1, 3, 7 e 14 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron, em híbridos de milho no estágio fenológico V3..... | 44 |
| Figura 9 – Altura de plantas de híbridos de milho (% em relação à testemunha) aos 3, 7 e 14 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V3 | 45 |
| Figura 10 – Porcentagem de fitointoxicação em híbridos de milho aos 3, 7 e 14 dias após a aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V3 | 46 |
| Figura 11 - Massa seca (% em relação à testemunha) de híbridos de milho aos 14 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V3..... | 48 |
| Figura 12 – Teor do ácido aminobutírico (mg g^{-1} de massa seca) em dois híbridos de milho aos 1, 3, 7 e 14 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V3..... | 49 |
| Figura 13 – Teores dos aminoácidos valina (A) e leucina+isoleucina (B) em dois híbridos de milho aos 1, 3, 7 e 14 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V3 | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 14 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 1, 7, 10, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron, em oito híbridos de milho no estágio fenológico V2 | 52 |
| Figura 15 – Altura de plantas de híbridos de milho (% em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V2 | 55 |
| Figura 16 - Altura de plantas de híbridos de milho (% em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V6 | 56 |
| Figura 17 - Altura acumulada em híbridos de milho (% em relação à testemunha) no estágio fenológico V2 (A) e V6 (B) e valores de fitointoxicação acumulada no estágio fenológico V2 (C) e V6 (D) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron | 58 |
| Figura 18 - Massa seca (% em relação à testemunha) de híbridos de milho aos 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V2 | 60 |
| Figura 19 - Massa seca (% em relação à testemunha) de híbridos de milho aos 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V6 | 61 |
| Figura 20 - Teores internos (A), externos (B) e totais (C) de nicosulfuron aplicado em híbridos de milho nos estádios fenológicos V2 e V6..... | 66 |
| Figura 21 - Teores do ácido aminobutírico (A), valina (B), leucina+isoleucina (C) e ácido quínico (D) com e sem aplicação do nicosulfuron em híbridos de milho no estágio fenológico V2..... | 69 |
| Figura 22 - Correlação dos teores de aminobutírico (A), valina (B), leucina+isoleucina (C) e ácido quínico (D) em híbridos de milho com e sem aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V2..... | 73 |
| Figura 23 – Correlação dos teores de aminobutírico com valores de altura (A) e fitointoxicação (B) acumulada, em oito híbridos de milho após aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V2 | 74 |
| Figura 24 - Teores do ácido aminobutírico (A), valina (B), leucina+isoleucina (C) e ácido quínico (D) com e sem aplicação do nicosulfuron em híbridos de milho no estágio fenológico V6..... | 75 |
| Figura 25 - Correlação dos teores de aminobutírico (A), valina (B), leucina+isoleucina (C) e ácido quínico (D) em híbridos de milho com e sem aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V6..... | 80 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 21 |
| 2.1 | A cultura do milho e sua importância econômica | 21 |
| 2.1.1 | Interferência de plantas daninhas na cultura do milho | 23 |
| 2.2 | Controle de plantas daninhas na cultura do milho | 24 |
| 2.2.1 | Controle químico de plantas daninhas | 25 |
| 2.3 | Seletividade de herbicidas | 27 |
| 2.3.1 | Nicosulfuron | 29 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 3.1 | Experimento 1 - Épocas de coleta para determinação do ácido aminobutírico | 33 |
| 3.2 | Experimento 2 - Sensibilidade de híbridos de milho ao nicosulfuron em dois estádios fenológicos | 34 |
| 3.2.1 | Taxa de transporte de elétrons e análise de crescimento | 36 |
| 3.2.2 | Teores de clorofila | 37 |
| 3.2.3 | Determinação dos compostos | 38 |
| 3.3 | Análise estatística | 43 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 4.1 | Experimento 1 - Épocas de coleta para determinação do ácido aminobutírico | 44 |
| 4.2 | Experimento 2 - Sensibilidade de híbridos de milho ao nicosulfuron em dois estádios fenológicos | 51 |
| 4.2.1 | Taxa de transporte de elétrons e análise de crescimento | 51 |
| 4.2.2 | Teores de clorofila | 62 |
| 4.2.3 | Determinação dos compostos | 65 |
| 5 | CONCLUSÕES | 81 |
| | REFERÊNCIAS | 83 |
| | APÊNDICE A – Fitointoxicação em híbridos de milho aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) dias após aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V2 | 91 |

| | |
|---|-----------|
| APÊNDICE B – Fitointoxicação em híbridos de milho aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) dias após aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V6..... | 92 |
|---|-----------|

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos mais importantes cereais cultivados no mundo, é um alimento de elevado valor energético e de custo relativamente baixo, a importância econômica dessa cultura é caracterizada pelas diversas formas que é utilizado, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, e assim como acontece no cenário mundial, o milho é uma das espécies agrícolas de maior importância no país, tanto em relação à área cultivada quanto à produção. Além disso, esse cereal é importante fonte de energia em regiões com baixa renda, representando também elevada importância social (CRUZ et al., 2011; MÔRO; FRITSCHÉ-NETO, 2015).

Os efeitos negativos causados pela interferência das plantas daninhas podem causar prejuízos no desenvolvimento das plantas de milho (ZAGONEL; VENÂNCIO; KUNZ, 2000). A competição estabelecida entre plantas daninhas e a planta cultivada pode levar a perdas no rendimento da cultura de até 70%, variando em função do tipo de solo, do estágio de desenvolvimento da cultura, das espécies de plantas daninhas que infestam a área, do grau de infestação e das condições ambientais (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). Nesse sentido, o manejo de plantas daninhas é fundamental para garantir uma boa produtividade na cultura do milho quando essas plantas se desenvolvem no mesmo espaço e período de tempo da cultura, estabelecendo um processo competitivo pois para o seu crescimento e desenvolvimento necessitam dos mesmos fatores exigidos pela cultura (CONTIERO, 2009).

A aplicação de herbicidas é um método de controle altamente empregado nas lavouras de milho, sendo uma prática fundamental para o manejo das plantas daninhas, principalmente em situações de altas infestações. O controle químico é considerado como método mais viável em grandes propriedades, devido à maior agilidade e eficiência dos herbicidas (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2003; VARGAS; PEIXOTO; ROMAN, 2006).

Os herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS, também denominada acetohidroxi-ácido sintase, AHAS) estão entre os produtos químicos mais utilizados no controle de plantas daninhas desde a sua introdução no mercado no início dos anos 80, incluindo cinco grupos químicos: sulfonilureias, imidazolinonas,

triazolopirimidinas, pirimidiltiobenzoatos e sulfonilamina carbonil triazolinonas (ZHOU et al., 2007). Atualmente, os produtos com esse mecanismo de ação são utilizados na maioria das culturas agrícolas, pois apresentam amplo espectro de ação controlando plantas daninhas mono e dicotiledôneas com o emprego de baixas doses, além disso são altamente seletivos e possuem baixa toxicidade a organismos não-alvo como mamíferos, peixes, aves e insetos (SHANER, 1999).

No Brasil, o registro de herbicidas do grupo químico das sulfonilureias como, por exemplo, o nicosulfuron e foransulfuron + iodossulfuron, possibilitou novas perspectivas para o controle de plantas daninhas na cultura do milho. A sensibilidade do milho ao nicosulfuron está relacionada à capacidade da cultura em metabolizar o herbicida em compostos não ativos, sendo assim, cultivares tolerantes de milho metabolizam herbicidas sulfonilureias de maneira mais rápida. A tolerância diferencial de híbridos de milho ao nicosulfuron requer maior cuidado na aplicação do herbicida, devendo se limitar aos cultivares que tolerem o produto (RIZZARDI et al., 2014).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi determinar a sensibilidade de híbridos de milho ao herbicida nicosulfuron por meio de marcadores bioquímicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho e sua importância econômica

O milho é uma gramínea que pertence à família Poaceae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays*, tendo como possível região de origem a América Central, onde se encontram seus ancestrais mais próximos. Essa planta vem sendo utilizada desde os primórdios da agricultura, sendo seu processo de domesticação iniciado há mais de 10 mil anos (PATERNIANI; CAMPOS, 2005).

De toda produção agrícola no mundo, a produção de milho é uma das maiores e mais expressivas, sendo o cereal mais cultivado. Devido ao seu valor econômico e o alcance social e geográfico da produção, o milho é considerado espécie indispensável para a humanidade. A principal utilização é como fonte de energia através do amido de seus grãos, sendo destinado para alimentação humana como também para alimentação animal, constitui-se como o principal ingrediente de rações, sendo indispensável na cadeia produtiva de aves e suínos no Brasil. Além disso, o milho é uma importante fonte de matéria-prima para a indústria de alta tecnologia, tendo uso industrial relevante na produção de etanol (FRANCISCO; KAPPES, 2012; MÔRO; FRITSCHÉ-NETO, 2015; TESTA; SILVESTRO, 2012).

Os Estados Unidos, a China e o Brasil são os maiores produtores mundiais de milho e produziram, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 345,4, 224,5 e 84 milhões de toneladas na safra de 2015/2016, respectivamente. Os principais países responsáveis pela maior parte da exportação desse grão e conseqüentemente pelo abastecimento do mercado mundial de milho são os Estados Unidos, o Brasil, a Argentina e a Ucrânia (USDA, 2017).

O consumo mundial do milho vem aumentando nos últimos anos, esse processo está relacionado principalmente ao aumento na demanda de milho utilizado na alimentação animal, que na safra 2018/2019 ultrapassou 660 milhões de toneladas, representando um incremento de aproximadamente 14% quando comparado à safra de 2014/2015 (GUTH, 2018).

No Brasil, a produção de milho ocorre em duas épocas distintas de semeadura da cultura. A primeira época corresponde aos plantios de verão, ou primeira safra, realizados durante o período de chuvas, iniciando no mês de agosto na região Sul e estendendo-se até novembro nas regiões Sudeste e Centro-Oeste.

A segunda safra ou safrinha é o milho de sequeiro que normalmente é plantado após a colheita da soja precoce, no período de janeiro a abril, sendo cultivado principalmente na região Centro-Oeste e no Paraná (DUARTE; GARCIA; MIRANDA, 2015; GARCIA et al., 2008). Ocupando aproximadamente 16,6 milhões de hectares, a cultura do milho encontra-se amplamente disseminada pelo território nacional, sendo produzida em praticamente todos os estados. A maior produção está concentrada na região Centro-Oeste, e o estado do Mato Grosso destaca-se como maior produtor com 26,4 milhões de toneladas produzidas na safra 2017/2018, seguida das regiões Sul e Sudeste que produziram nessa mesma safra 19,2 e 11,1 milhões de toneladas de milho, respectivamente (CONAB, 2018).

Apesar de apresentar elevada importância econômica no país, a cultura tem apresentado baixa produtividade média, em torno de 4 t ha^{-1} nas últimas safras, quando comparado com as elevadas produtividades obtidas nos Estados Unidos que chegam a 9 t ha^{-1} (SANGOI; SILVA, 2012). De acordo com Garcia e Duarte (2011), por ser calculada englobando regiões que apresentam grande diversidade em relação ao sistema de cultivo como também em relação à finalidade de produção, essa baixa produtividade não representa o desenvolvimento tecnológico que vem sendo alcançado por grande parte dos produtores que gerenciam lavouras comerciais.

Cruz et al. (2011) evidencia a existência de uma dualidade na produção do milho no Brasil onde um elevado número de pequenos produtores praticam agricultura de subsistência, não são altamente tecnificados e não possuem recursos para alcançar elevadas produtividades, enquanto uma pequena parcela de grandes produtores dispõem de mais terras, tecnologias e capital, alcançando produtividades equivalentes à de países de agricultura mais avançada.

A divergência nos níveis de produtividade entre as diversas regiões produtoras de milho no país pode estar relacionada à utilização de genótipos de baixo potencial ou sementes de baixa qualidade, genótipos não adaptados à região de produção, arranjo de plantas inadequado, aplicação de baixas doses de fertilizantes, bem como a interferência imposta pela presença de plantas daninhas (SANGOI; SILVA, 2012).

2.1.1 Interferência de plantas daninhas na cultura do milho

No cenário agrícola, as atividades voltadas para controle de plantas daninhas representam cerca de 20 a 30% dos custos de produção (SILVA et al., 2009). Para a produção de milho esses gastos não podem ser evitados pelos produtores, pois um dos principais fatores que levam a baixa produtividade da cultura é o controle inadequado ou a ausência de controle de plantas daninhas (SILVA et al., 2015).

As plantas daninhas interferem nas plantas cultivadas através da competição pelos recursos necessários ao crescimento e desenvolvimento como luz, água, nutrientes e espaço; e por liberarem substâncias alelopáticas no ambiente que podem ser prejudiciais ao desenvolvimento e a produtividade da cultura. Além disso, as plantas daninhas desempenham um papel importante quando hospedam pragas, doenças e nematoides (PITELLI, 1987).

A interferência de plantas daninhas pode afetar significativamente o crescimento e o rendimento de grãos da cultura do milho. Embora seja considerada uma cultura competitiva, as perdas de rendimento devido à interferência podem ser de 10 a mais de 80%, variando de acordo com o estágio fenológico da cultura, as espécies e a densidade de plantas daninhas presentes e o período de convivência entre as plantas daninhas e a cultura (RIZZARDI et al., 2014; SILVA et al., 2015; VARGAS, PEIXOTO, ROMAN, 2006).

A produção da cultura normalmente é utilizada como parâmetro para avaliação do grau de interferência das plantas daninhas (PITELLI, 2014). No entanto essas plantas também podem afetar outras características da planta cultivada. Rossi et al. (1996) observaram que o comprimento e o peso das espigas, o peso dos grãos e a altura de inserção da primeira espiga foram afetados negativamente pela presença de plantas daninhas para todos os cultivares estudados.

As plantas daninhas presentes nas áreas de produção de milho também são responsáveis por provocar maturação desuniforme e reduzir a qualidade dos grãos, bem como por dificultar a operação de colheita devido ao embuchamento das máquinas, levando a perdas durante esse processo (SILVA et al., 2015; VARGAS, PEIXOTO, ROMAN, 2006;). Além disso, a competição por luz durante a fase vegetativa do milho gera um estresse que culmina no atraso da emissão do pendão e dos estigmas, afetando assim o processo de polinização da cultura (RIZZARDI et al., 2014).

A época de início de controle das plantas daninhas é de extrema importância, pois a duração do período em que as plantas daninhas e as plantas cultivadas convivem e disputam pelos recursos limitantes do meio pode influenciar o desenvolvimento e a produção da cultura do milho (MEROTTO JR. et al., 2000).

O período crítico de competição na cultura do milho pode ser bastante variável, dependendo do genótipo, da época de semeadura, das condições climáticas, da densidade e das espécies de plantas daninhas presentes na área. Esse período tem sido relatado por diversos autores em condições distintas, mas de maneira geral ocorre dos 15 até os 50 dias após a emergência da cultura (KARAM; RIZZARDI; CRUZ, 2008; RIZZARDI et al., 2014). Considerando-se a fenologia do milho, Kozlowski (2002) verificou que o período crítico de prevenção da interferência corresponde ao intervalo entre os estádios fenológicos V2 a V7, ou seja, de 2 a 7 folhas totalmente expandidas. O autor destaca a importância da utilização da fenologia da cultura como base para que técnicas de manejo adequadas ao estágio de desenvolvimento da planta sejam implementadas.

2.2 Controle de plantas daninhas na cultura do milho

Para que o controle de plantas daninhas seja realizado de maneira adequada é importante que a estratégia de manejo apresente eficiência técnica e econômica. O método de controle mais adequado para a cultura inserida em um ambiente específico, deve ser escolhido com base nas condições climáticas, nas principais espécies de plantas daninhas presentes, na disponibilidade de equipamento e mão-de-obra, bem como nos riscos associados à falha de controle. O fator ambiental também vem sendo considerado por alguns agricultores (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000; GUNSOLUS, 1990).

Dentre os métodos de controle de plantas daninhas que podem ser empregados na cultura do milho, atualmente destacam-se os métodos mecânicos, culturais e principalmente químicos, através da aplicação de herbicidas. Entretanto, é importante que essas medidas sejam integradas, pois quando empregadas de maneira isolada, podem não ser suficientes para prevenir toda a interferência exercida pelas plantas daninhas sobre a cultura (SEVERINO; CARVALHO; CHRISTOFFOLETI, 2005). O manejo integrado de plantas daninhas na cultura do

milho tem como objetivo, além da racionalização do uso de herbicidas, proteger o ambiente e diminuir os custos de produção (KARAM; RIZZARDI; CRUZ, 2008; MEROTTO JUNIOR et al., 1997; RIZZARDI et al., 2014).

O controle cultural baseia-se na adoção de técnicas para que a cultura manifeste seu máximo potencial produtivo, favorecendo assim as plantas cultivadas em relação ao potencial competitivo das plantas daninhas (MACIEL, 2014). A utilização de cultivares mais competitivos e modificações no arranjo espacial de plantas de milho influenciam em diversos fatores que são cruciais para a produtividade de grãos, havendo ou não a competição interespecífica. A competitividade da cultura com as plantas daninhas pode ser favorecida pela escolha de genótipos com características como elevada estatura e rápido crescimento inicial (BALBINOT JUNIOR; FLECK, 2004).

Os plantios com populações elevadas e espaçamentos estreitos promovem maior e mais rápido fechamento do solo, Merotto Junior et al. (1997) observaram reduções da matéria seca das plantas daninhas com o aumento da população de plantas de milho, promovendo assim um aumento do rendimento de grãos da cultura. Além disso, a época de plantio, o uso de cobertura morta, rotação de culturas, adubação adequada e um bom manejo de irrigação também são técnicas do manejo cultural que aumentam a capacidade competitiva da cultura (KARAM; MELHORANÇA; OLIVEIRA, 2008).

2.2.1 Controle químico de plantas daninhas

As medidas preventivas, culturais e mecânicas são essenciais no manejo das plantas daninhas, no entanto o controle químico através da aplicação de herbicidas é, em muitos casos, necessário para garantir o controle efetivo das invasoras, principalmente quando o banco de sementes de plantas daninhas no solo é elevado e quando há predominância de espécies altamente competitivas, representando grande potencial de dano à cultura, sendo assim, um método fundamental para garantir elevadas produtividades (BALBINOT JUNIOR; TREZZI, 2012).

O controle químico é considerado uma operação que demanda elevado investimento inicial e por isso é recomendado para lavouras de médio e grande porte

que possui nível tecnológico elevado onde busca-se altas produtividades (MELHORANÇA et al., 2015).

Os herbicidas utilizados na cultura do milho podem ser aplicados em épocas distintas. O controle de plantas daninhas utilizando herbicidas em pré-emergência vem sendo realizado há muitos anos, no entanto esses herbicidas dependem dos níveis de precipitação, que refletem na umidade do solo, para que possuam elevada eficácia de controle. Devido à possibilidade de ocorrência de condições inadequadas para atuação dos herbicidas aplicados em pré-emergência, do desenvolvimento de herbicidas pós-emergentes eficientes no controle de gramíneas e folhas largas e do desenvolvimento de culturas resistentes a herbicidas, as aplicações em pós-emergência apresentaram alto crescimento nos programas de controle de plantas daninhas na cultura do milho (TAPIA et al., 1997; WHALEY et al., 2006).

A aplicação em pré-semeadura também é uma opção de manejo, os herbicidas são aplicados antes do plantio da cultura e o tempo necessário entre a aplicação e a semeadura varia em função das características do herbicida, das condições climáticas, da textura do solo e da presença de cobertura vegetal. Além disso, podem ser realizadas aplicações em jato dirigido nas entrelinhas. Nas aplicações em pré-emergência, a maioria dos herbicidas utilizados pertence aos grupos químicos das triazinas e das amidas, e entre os aplicados em pós-emergência destacam-se os herbicidas pertencentes ao grupo químico das sulfonilureias como, por exemplo, o nicosulfuron e foransulfuron + iodossulfuron (KARAM; RIZZARDI; CRUZ, 2008; RIZZARDI et al., 2014).

Dois importantes fatores devem ser considerados ao se utilizar o controle químico, a eficiência do herbicida para as principais espécies de plantas daninhas presentes na lavoura e sua seletividade na cultura (MELHORANÇA et al., 2015). A época de aplicação dos herbicidas na cultura do milho também é um fator importante. Zagonel, Venâncio e Kunz (2000) observaram redução nos componentes de produção, como o número de espigas por planta, e na produtividade do milho com o atraso na época de controle das plantas daninhas, sendo que a produtividade apresentou queda acentuada quando o controle ocorreu a partir dos 18 dias após a emergência do milho, evidenciando assim vantagem do controle precoce de plantas daninhas sobre a produtividade da cultura. Além disso, o estágio fenológico da cultura durante a época de aplicação é essencial para determinar a seletividade do herbicida, se o momento de aplicação for inadequado, o

herbicida pode provocar injúrias na cultura reduzindo sua produção (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2003).

2.3 Seletividade de herbicidas

No ambiente agrícola, um fator imprescindível para que o controle químico de plantas daninhas seja eficiente é a seletividade dos herbicidas, que é considerada como uma medida da resposta diferencial de espécies de plantas a um herbicida específico. Sendo assim, um herbicida seletivo é aquele que é mais tóxico para determinadas plantas do que para outras, considerando os mesmos limites de dose, condições ambientais e métodos de aplicação (OLIVEIRA JR.; INOUE, 2011). Nesse sentido, Negrisoni et al., (2004) ressalta que o herbicida seletivo é capaz de eliminar as plantas daninhas presentes em uma determinada cultura sem afetar a produtividade e a qualidade do produto final.

As interações entre as condições edafoclimáticas, as características físico-química dos herbicidas e as características anatômicas, morfo-fisiológicas e bioquímicas da planta também estão relacionadas com a seletividade do herbicida. Dentre os fatores que compõe essas interações e determinam a seletividade do herbicida, destacam-se os fatores inerentes ao herbicida como a estrutura molecular, formulação, dose, propriedades físico-químicas das moléculas e modo de aplicação que pode influenciar na localização espacial ou temporal do herbicida em relação à planta, bem como os fatores inerentes à planta como o estágio de desenvolvimento, mecanismos de absorção e translocação diferencial e metabolismo diferencial (AZANIA; AZANIA, 2014).

Um dos principais mecanismos de seletividade de herbicidas nas plantas é o metabolismo diferencial, que pode ocorrer através da ativação, que consiste na transformação da molécula parental em um metabólito biologicamente ativo, ou via inativação (HOAGLAND; ZABLOTOWICZ; HALL, 2000). Nesse processo muitos são os casos em que as plantas cultivadas possuem maior habilidade de metabolizar as moléculas do herbicida, transformando-as em substâncias não tóxicas, quando comparado com as plantas daninhas (COLE, 1994).

A inativação do herbicida baseia-se na sua transformação química em compostos derivados que são quimicamente distintos, envolvendo uma ou mais

reações catalisadas por enzimas. Tanto as taxas de metabolização quanto os metabólitos formados nesse processo dependem das espécies vegetais. Os produtos da transformação química normalmente são menos tóxicos e mais hidrofílicos (caracterizando menor mobilidade na planta) do que o composto original, fato que consolida o efeito de desintoxicação (COLE, 1994; COLEMAN; BLAKE-KALFF; DAVIES, 1997).

O metabolismo do herbicida é geralmente dividido em três fases: Fase I (conversão), Fase II (conjugação) e Fase III (compartimentalização). A Fase I é provavelmente a fase mais importante do metabolismo de pesticidas nas plantas (SHIMABUKURO; LAMOUREUX; FREAR, 1982), pois estes são submetidos a modificações através dos processos de oxidação, redução ou hidrólise que tipicamente aumentam a polaridade, diminuem (ou em alguns casos aumentam) a fitotoxicidade da molécula parental (HATZIOS, 1997). Embora os produtos das reações de fase I sejam mais hidrofílicos do que o xenobiótico original, a função primária desta fase é fornecer locais reativos no xenobiótico através da adição ou exposição de grupos funcionais (como hidroxila ou carboxila), predispondo os compostos para as reações da Fase II (COLEMAN; BLAKE-KALFF; DAVIES, 1997). A segunda fase envolve a conjugação do herbicida ou seu metabólito com aminoácidos, glicose ou glutatona, originando metabólitos solúveis em água, não tóxicos e relativamente imóveis na planta. A Fase III pode envolver conjugação secundária seguida do transporte dos conjugados para compartimentos como o vacúolo e a parede celular, onde pode ocorrer metabolismo adicional (HATZIOS, 1997; SHIMABUKURO; LAMOUREUX; FREAR, 1982).

As principais enzimas responsáveis pelas transformações oxidativas da fase I são as do complexo P450 que catalisam reações como hidroxilação e N-desalquilação. Já as transformações da fase II são processos conjugativos geralmente catalisados pela glutatona S-transferase (GSTs). Os complexos enzimáticos GST e o citocromo P450 são responsáveis pela detoxificação de grande parte dos herbicidas na maioria das plantas (ZABLOTOWICZ; HOAGLAND; HALL, 2005).

Uma das causas que impulsionaram a pesquisa do metabolismo de herbicidas mediada pelo P450 foi a descoberta e a comercialização de herbicidas pertencentes aos inibidores da ALS. Esses herbicidas apresentaram características como baixa toxicidade em mamíferos, boa seletividade para culturas e propriedades

favoráveis ao ambiente em comparação com as antigas moléculas e as P450s desempenham um papel fundamental no metabolismo de vários produtos desta classe de herbicidas (SIMINSZKY, 2006).

As sulfonilureias e as imidazolinonas, grupos químicos de herbicidas inibidores da ALS, são exemplos de herbicidas altamente seletivos por passarem pelo processo de desativação metabólica onde as espécies tolerantes e as espécies sensíveis apresentam elevadas diferenças na sensibilidade. Para os herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas, os metabólitos formados pela planta são muito menos tóxicos do que os compostos originais (OLIVEIRA JR.; INOUE, 2011). Já para as sulfonilureias Carey, Penner e Kells (1997) compilando informações de diversos autores, relataram que a base principal para a seletividade desses herbicidas é a taxa diferencial do metabolismo onde espécies tolerantes desintoxicam rapidamente sulfonilureias gerando compostos inativos, enquanto em espécies sensíveis o metabolismo é muito mais lento e menos intenso.

De acordo com Barrett (1995) as monooxigenases dependentes do citocromo P450 têm sido consideradas um complexo enzimático de grande importância para a desintoxicação de herbicidas em milho, desempenhando um papel tão importante quanto a glutathione S-transferase para o metabolismo de herbicidas. O autor afirma ainda que a mudança no papel da P450 na seletividade de herbicidas em milho pode estar relacionada com a introdução de novas classes de herbicidas na cultura, que podem atuar como substratos mais eficientes para as isoenzimas P450 do milho quando comparado aos produtos mais antigos. Além disso, os herbicidas mais novos (imidazolinonas, sulfonamidas, sulfonilureias) são aplicados em doses mais baixas, sendo a atividade do P450 suficiente para a desintoxicação do herbicida antes que injúrias ocorram na cultura.

2.3.1 Nicosulfuron

Dentre os principais herbicidas utilizados na cultura do milho destaca-se o nicosulfuron CC1=CC=C(C=C1)C(=O)N(C)C(=O)N2C=CC(=C2)C3=CC(=C(C=C3)OC)OC, que é um herbicida sistêmico seletivo para a cultura, recomendado para aplicação em pós-emergência no controle de plantas daninhas poáceas e algumas dicotiledôneas. A meia-vida do nicosulfuron no campo

é de 21 dias, já nas plantas de milho a meia-vida do herbicida é de aproximadamente cinco horas enquanto que nas plantas sensíveis pode ser de diversos dias (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

O nicosulfuron pertence ao grupo químico das sulfonilureias, os herbicidas desse grupo inibem a acetolactato sintase (ALS), também denominada acetohidroxi-ácido sintase (AHAS), que é a primeira enzima comum à rota dos aminoácidos essenciais de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. A enzima ALS catalisa duas reações em paralelo, na primeira delas onde ocorre a biossíntese de valina e leucina, duas moléculas de piruvato são condensadas resultando em 2-acetolactato. Já na segunda reação, para a formação de isoleucina, uma molécula de piruvato reage com 2-cetobutirato originando acetohidroxibutirato (DURNER; GAILUS; BOGER, 1991; MCCOURT et al., 2006).

A enzima ALS regula a velocidade de síntese desses aminoácidos em função da quantidade disponível e da necessidade de utilização na síntese de proteínas (VIDAL et al., 2014). Com a ligação do herbicida, a atividade catalítica dessa enzima é reduzida ou bloqueada resultando na deficiência de aminoácidos de cadeia ramificada e essas reduções drásticas nos níveis de valina, leucina e isoleucina acredita-se ser o mecanismo primário pelo qual os herbicidas inibidores da ALS causam inibição de crescimento e morte das plantas (SHANER, 1991; SHANER; SINGH, 1992). Além disso, um efeito secundário da aplicação de herbicidas desse mecanismo de ação é o acúmulo de 2-cetobutirato (α -cetobutirato ou 2-KB) ou do 2-aminobutirato (2-AB, que é o produto da transaminação de 2-KB) (LAROSSA; DYK; SMULSKI, 1987; RHODES et al., 1987; SHANER, 1991; ZHOU et al., 2007).

Em estudos realizados por Shaner e Singh (1993) foi observado o acúmulo de elevados teores de 2-cetobutirato e 2-aminobutirato em plantas tratadas com imazaquin, no entanto esses autores concluíram que não existe uma relação entre os teores desses compostos na planta e a inibição do crescimento das mesmas, indicando que a fitotoxicidade causada por esse grupo de herbicidas não se deve ao acúmulo de 2-cetobutirato e/ou 2-aminobutirato. Entretanto, Dayan et al. (2015) afirma que os efeitos dos herbicidas inibidores da ALS podem ser medidos através da extração e quantificação do acúmulo de 2-aminobutirato utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

As espécies de plantas variam quanto à sensibilidade aos herbicidas inibidores da ALS (WHITCOMB, 1999), para os herbicidas pertencentes ao grupo

das sulfonilureias o processo de metabolização gerando compostos inativos é um fator chave para tolerância das culturas, em experimentos realizados na cultura do milho evidenciou-se que esses herbicidas são inicialmente metabolizados pela ação do citocromo P450 principalmente através de reações de hidroxilação (FONNE-PFISTER et al., 1990).

Carey, Penner e Kells (1997) com o objetivo de determinar a base fisiológica para seletividade de nicosulfuron em diversas espécies de plantas observaram que o milho foi capaz de metabolizar o herbicida de forma rápida e intensiva com apenas 20% do herbicida permanecendo em sua forma original após 12 horas, e as espécies tolerantes ao herbicida foram capazes de metaboliza-lo mais eficientemente do que as espécies sensíveis, sendo assim, a taxa de metabolismo do herbicida pode ser considerada um dos principais fatores que determinam se o milho é tolerante ou sensível ao nicosulfuron.

Cerca de 40% do nicosulfuron aplicado à superfície das folhas de uma espécie tolerante como o milho ou de espécies sensíveis como o capim-massarombá (*Sorghum halepense*) foi absorvido. No entanto, mais de 90% do nicosulfuron absorvido foi metabolizado pelo milho em 20 horas, já para o capim-massarombá mesmo um dia após a aplicação não houve metabolismo perceptível do nicosulfuron (OBRIGAWITCH; KENYON; KURATLE, 1990)

Segundo Rodrigues e Almeida (2011), o nicosulfuron é seletivo para grande parte dos cultivares comerciais de milho, no entanto, existem alguns híbridos para os quais a aplicação desse produto não é recomendada. Sintomas iniciais de fitotoxicidade podem ser observados mesmo para os híbridos tolerantes. A tolerância diferencial de híbridos de milho ao herbicida nicosulfuron foi evidenciada por diversos autores (CAVALIERI et al., 2008; DAMIÃO FILHO; MÔRO; TAVEIRA, 1996; MORTON; HARVEY, 1992). Os híbridos considerados tolerantes a esse herbicida podem apresentar diferentes níveis de sensibilidade que variam de acordo com a dose aplicada, com o estágio fenológico da planta e também com as condições ambientais no momento da aplicação (GUBBIGA et al., 1995; MORTON; HARVEY, 1992).

Spader e Vidal (2001) avaliando a seletividade de nicosulfuron aplicado em três estágios de desenvolvimento (V_3 , V_6 e V_9 representando 3, 6 e 9 folhas completamente desenvolvidas, respectivamente) de um híbrido de milho considerado tolerante ao herbicida, observaram que a tolerância do milho é maior

nos estádios iniciais de desenvolvimento e a seletividade de nicosulfuron para a cultura diminui a partir do estágio de 6 folhas completamente expandidas, reduzindo o peso e o rendimento de grãos quando aplicado nos estádios V₆ e V₉.

Para o milho pipoca aplicado com nicosulfuron nos estádios fenológicos V₃, V₅ e V₇ foram observados efeitos significativos em relação à intoxicação, redução de altura, comprometimento dos componentes de produção e consequente redução de produtividade de grãos quando o nicosulfuron foi aplicado no estágio V₇ para as maiores doses testadas (70 e 140 g ha⁻¹). Evidenciando assim a importância da observação do estágio fenológico das plantas de milho-pipoca para que a aplicação do nicosulfuron seja realizada no momento adequado sem afetar a produtividade da cultura, uma vez que as plantas se mostram mais sensíveis à aplicação desse herbicida nos estádios mais avançados de desenvolvimento (CAVALIERI et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação 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.

Cada unidade experimental foi constituída por vasos de 1,7 litros preenchidos com substrato Carolina[®], composto de turfa de esfagno, vermiculita e casca de arroz carbonizada, com pH 5,7 ($\pm 0,5$). Foram semeadas cinco sementes por vaso, e após a emergência das plantas foi realizado um desbaste, permanecendo três plantas de milho viáveis por vaso. Durante todo o experimento as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação em condição de plena luz.

Para aplicação dos tratamentos foi utilizado um pulverizador pertencente ao NUPAM, constituído por estrutura metálica (barra de pulverização) com 2 metros de largura, tracionada por um conjunto de motor elétrico e modulador de frequência, sendo assim possível controlar a velocidade de trabalho. A barra é composta por quatro pontas de pulverização XR 110.02 VS, espaçadas em 0,5 m e dispostas a 0,5 m de altura em relação às unidades experimentais. A pressão de trabalho utilizada no equipamento foi de 2,0 kgf cm⁻², com velocidade de 3,6 km h⁻¹ e consumo de calda de 200 L ha⁻¹.

3.1 Experimento 1 - Épocas de coleta para determinação do ácido aminobutírico

O primeiro experimento foi realizado com o objetivo de definir a época ideal para coletar as plantas de milho para posterior determinação do ácido aminobutírico e dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Esse experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições no esquema fatorial 4 x 2, utilizou-se quatro híbridos de milho (NS 50 PRÓ II; CD 384; DKB 290 PRÓ III e NS 56 PRÓ III) e duas doses do herbicida (0 e 120 g i.a. ha⁻¹). A aplicação foi realizada quando as plantas encontravam-se no estágio fenológico V3 (três folhas completamente expandidas).

Foram realizadas avaliações da taxa de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR) aos 1, 3, 7 e 14 dias após a aplicação (DAA) do herbicida, utilizando o fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS5p – Opti Sciences), com leituras realizadas em dois pontos da última folha completamente expandida. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao tratamento não aplicado que foi considerado como 100%.

Avaliações de fitointoxicação foram realizadas aos 3, 7 e 14 DAA adotando-se a porcentagem de 0 a 100 (0 representa ausência de sintomas e 100% representa a morte das plantas) (SBCPD, 1995). A altura das plantas foi determinada aos 3, 7 e 14 DAA através de medidas do nível do solo até a inserção da lígula da última folha expandida. Aos 14 DAA as plantas foram coletadas para determinação da massa seca. Para o híbrido que se mostrou mais sensível e o mais tolerante, as plantas foram coletadas aos 1, 3, 7 e 14 DAA para a determinação dos compostos.

3.2 Experimento 2 - Sensibilidade de híbridos de milho ao nicosulfuron em dois estádios fenológicos

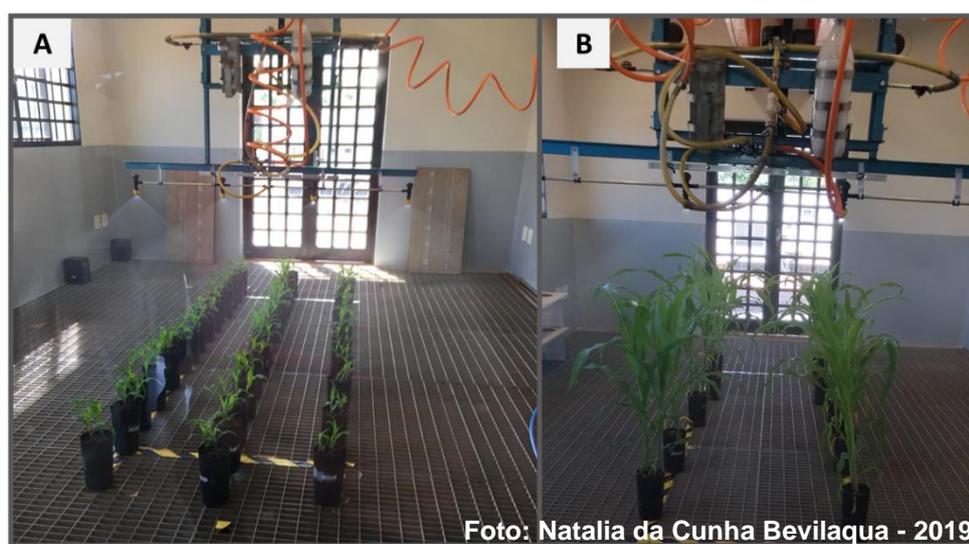
O segundo experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições em esquema fatorial 8 x 2 (híbridos x doses), as doses de nicosulfuron aplicadas foram 0 e 120 g i.a. ha⁻¹ e foram utilizados oito híbridos de milho (Tabela 1).

Tabela 1 – Identificação dos híbridos de milho utilizados no segundo experimento

| Identificação | Híbrido | Ciclo |
|---------------|-----------------|---------------|
| H1 | CD 384 PW | Precoce |
| H2 | DKB 290 PRÓ III | Precoce |
| H3 | CD 3612 PW | Precoce |
| H4 | NS 56 PRÓ III | Precoce |
| H5 | NS 50 PRÓ II | Superprecoces |
| H6 | P1680 VYH | Superprecoces |
| H7 | P30R50 VYH | Precoces |
| H8 | 2B587 PW | Precoces |

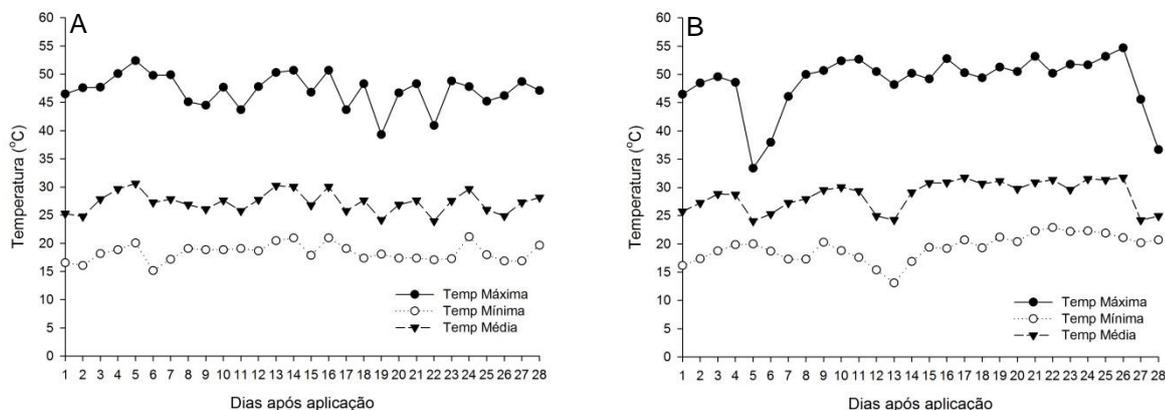
Esse experimento foi realizado em épocas distintas para dois estádios de desenvolvimento do milho: V2 e V6 representando duas e seis folhas completamente expandidas, respectivamente (Figura 1). Para o milho no estádio V2 o plantio ocorreu no dia 02/09/2018 e a aplicação foi realizada dia 19/09/2018. Já para o milho no estádio fenológico V6 o plantio foi feito dia 26/10/2018 e o nicosulfuron foi aplicado dia 26/11/2018.

Figura 1 - Aplicação de nicosulfuron em dois estádios de desenvolvimento do milho: V2 (A) e V6 (B).



No momento da aplicação do ensaio em que o milho se encontrava no estádio fenológico V2 as condições meteorológicas foram: temperatura de 21°C e umidade relativa do ar de 83%, já as condições meteorológicas no momento da aplicação do milho no estádio V6 foram: temperatura de 23°C e umidade relativa do ar de 68%. Os dados de temperatura máxima, mínima e média que ocorreram durante a condução desses ensaios estão apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Temperaturas máxima, média e mínima durante a condução dos experimentos. Estádio fenológico V2 (A) e V6 (B)



3.2.1 Taxa de transporte de elétrons e análise de crescimento

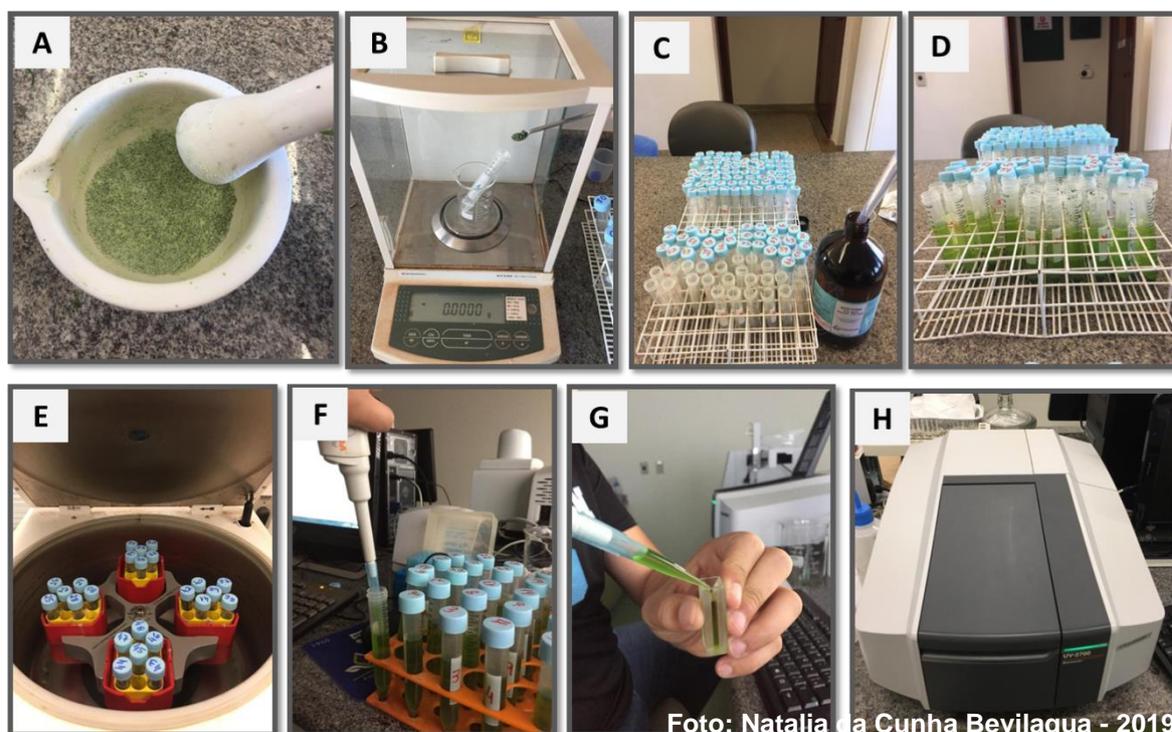
Para o experimento em que a aplicação ocorreu no estágio V2 foram realizadas avaliações da taxa de transporte de elétrons no fotossistema II aos 1, 7, 10, 14, 21 e 28 DAA, utilizando o fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS5p – Opti Sciences), com leituras realizadas em dois pontos da última folha completamente expandida em todas as repetições dos tratamentos. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao tratamento não aplicado que foi considerado como 100%. Para ambos os estádios fenológicos foram realizadas avaliações de fitointoxicação decorrentes da aplicação de nicosulfuron aos 7, 14, 21 e 28 DAA, no qual foram atribuídas notas visuais para cada repetição adotando-se a porcentagem de 0 a 100 (0 para ausência de sintomas e 100 para a morte das plantas) considerando sintomas visíveis de fitointoxicação como clorose foliar nas plantas (Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas – SBCPD, 1995). A altura das plantas foi determinada aos 7, 14, 21 e 28 DAA por meio da medida da altura do colmo, do solo até a lígula da última folha completamente expandida.

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

3.2.2 Teores de clorofila

Os teores de clorofila (*a*, *b* e total) e carotenoides foram determinados segundo Lichtenthaler (1987). As folhas das plantas foram coletadas aos 7 DAA, maceradas em nitrogênio líquido, pesadas (0,2 g do tecido macerado), acondicionadas em tubos “falcons” contendo 10 mL de fase acetona:água (80:20), mantidas no escuro por 30 minutos e posteriormente centrifugadas a 3095 g por 15 minutos sendo coletado 1 mL do sobrenadante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (UV-2700, UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Tokyo, Japan) nos comprimentos de onda de 663 e 647 nm para clorofilas *a* e *b*, e 470 nm para carotenoides (Figura 3). As determinações dos níveis de clorofila (mg g^{-1}) basearam-se nas equações propostas por Arnon (1949): Clorofila *a* = $(11,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{647})$; Clorofila *b* = $(21,5 \times A_{647} - 5,1 \times A_{663})$; Carotenoides = $(1000 \times A_{470} - 1,82 \times \text{Clorofila } a - 85,02 \times \text{Clorofila } b)/190$; em que, *A* é a absorbância no comprimento de onda indicado, além disso foi calculado o teor de clorofila total = $C_a + C_b$ (mg g^{-1}).

Figura 3 – Procedimentos para determinação dos teores de clorofila e carotenoides. Maceração das amostras (A), pesagem (B), adição da solução extratora (C,D), centrifugação (E) e leitura no espectrofotômetro (F, G, H).



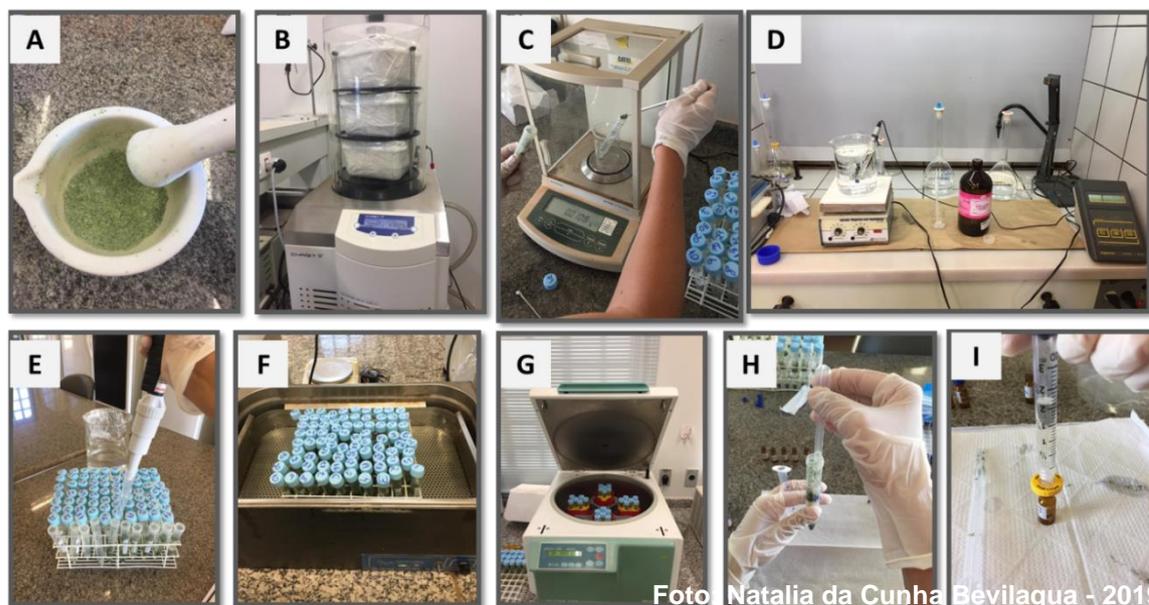
3.2.3 Determinação dos compostos

Um dia após a aplicação dos tratamentos, plantas de cada vaso foram coletadas e pesadas em balança analítica e acondicionadas em sacos plásticos nos quais foram adicionados 100 mL de água destilada para lavagem das mesmas. Este procedimento de lavagem foi realizado duas vezes, totalizando 200 mL de água. No experimento em que a aplicação foi realizada no estágio V6 de desenvolvimento do milho, as plantas coletadas foram submetidas a duas lavagens com 200 mL de água destilada, totalizando 400 mL de água. A solução total resultante da lavagem 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 em freezer.

Para a determinação do teor externo do herbicida na planta, 3 mL da solução proveniente da água de lavagem foram filtrados com filtros Millipore 0,45 μm e o conteúdo transferido para vials de 2 mL que foram levados para análise cromatográfica.

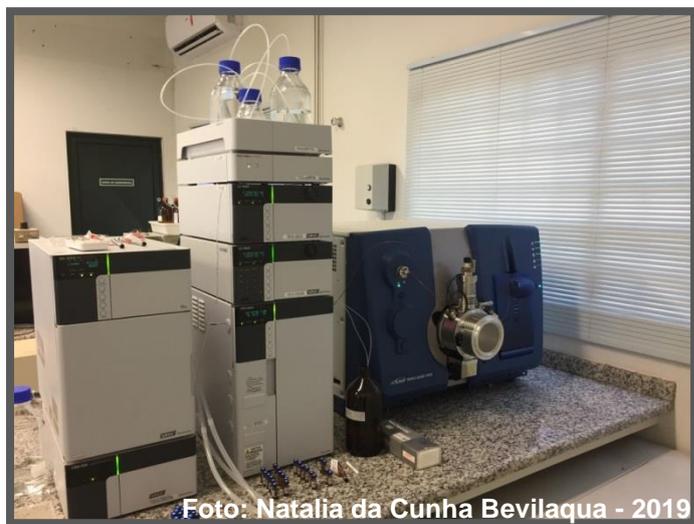
Para a determinação do teor interno do herbicida nicosulfuron, ácido aminobutírico, ácido quínico e aminoácidos valina, leucina e isoleucina, o material vegetal armazenado foi pulverizado com auxílio de nitrogênio, e logo após liofilizados por 72 horas. Em seguida, pesou-se em balança de precisão (0,0001g) uma alíquota de 0,1 g de cada amostra liofilizada, acondicionando-as em tubos falcon de 15 mL aos quais adicionou-se 10mL de água acidificada com ácido acético (pH 3,0). Os tubos foram submetidos ao banho de ultrassom durante 30 minutos, centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos e posteriormente foi realizada a filtração do sobrenadante das amostras com filtros Millipore 0,45 μm , transferindo o conteúdo filtrado para vials de 2 mL que foram levados para análise em cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (LC-MS/MS) (Figura 4).

Figura 4 – Procedimentos para determinação do teor interno dos compostos. Maceração (A), liofilização (B), pesagem (C), preparo e adição de água acidificada (D, E), sonicação (F), centrifugação (G) e filtragem (H, I) 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) (Figura 5). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 4500, Triple Quad, AB Sciex. 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 5 - Cromatógrafo líquido (Prominence UFLC) acoplado ao espectrômetro de massas (Triple Quad 4500, AB Sciex).



As condições cromatográficas para a quantificação dos compostos foram otimizadas para cada modo de ionização (Tabela 2). Escolheu-se o modo de ionização da fonte (eletrospray - ESI), que permite a detecção e a separação dos compostos em uma única corrida para os modos positivo e negativo. A massa molecular e os fragmentos gerados das moléculas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2 – Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos

| | |
|----------------------|--|
| Coluna Analítica | Gemini 5 μ C18RP 110Å (150 x 4,6 mm) |
| Volume de injeção | 20 μ l |
| Fase móvel (pH 7,0) | Fase A (FA) = 5mM acetato de amônio em água Fase B (FB) = 5mM acetato de amônio em metanol |
| 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 | 0,8 ml min ⁻¹ |
| Temperatura do forno | 40°C |

Tabela 3 – Massa molecular e fragmentos dos compostos analisados

| Composto | Massa molecular | Fragmento |
|---------------------|------------------------|------------------|
| Nicosulfuron | 411,094 | 181,800 |
| | | 212,800 |
| | | 106,000 |
| Ácido aminobutírico | 104,071 | 86,900 |
| | | 58,100 |
| | | 104,071 |
| Ácido quínico | 191,037 | 84,900 |
| | | 93,000 |
| | | 59,100 |
| Valina | 118,239 | 72,200 |
| | | 55,200 |
| | | 57,200 |
| Leucina | 132,041 | 86,100 |
| | | 122,800 |
| Isoleucina | 132,028 | 86,000 |
| | | 85,500 |

O tempo total de corrida para o nicosulfuron, ácido aminobutírico, ácido quínico e os aminoácidos valina, leucina e isoleucina foi de 10 minutos, com retenção na coluna cromatográfica de 5,15; 2,15; 2,19; 2,49; 3,30 e 3,53 minutos, respectivamente. Os cromatogramas desses compostos estão apresentados nas Figuras 6 e 7.

Os teores do herbicida e dos demais compostos foram expressos em mg g^{-1} de massa seca (mg g ms^{-1}) das plantas. Para os aminoácidos leucina e isoleucina devido à similaridade da massa molecular de ambos os compostos, do tempo de retenção e área de quantificação, optou-se por apresentar os resultados da soma desses dois compostos ao longo do texto.

Figura 6 – Cromatograma obtido para o nicosulfuron (37,5 ng ml⁻¹)

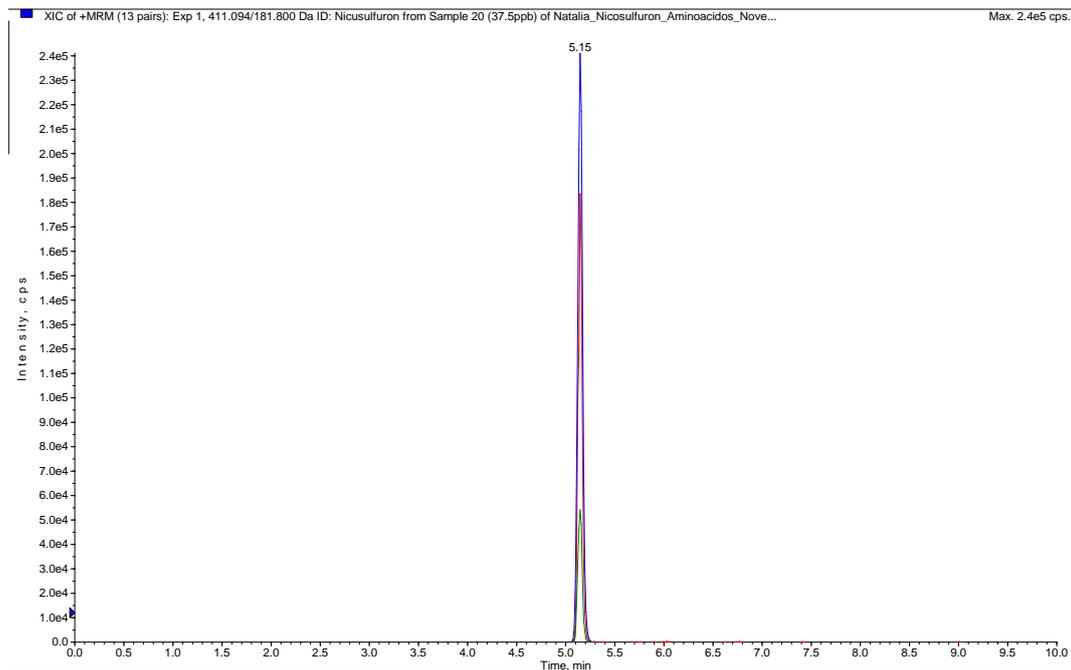
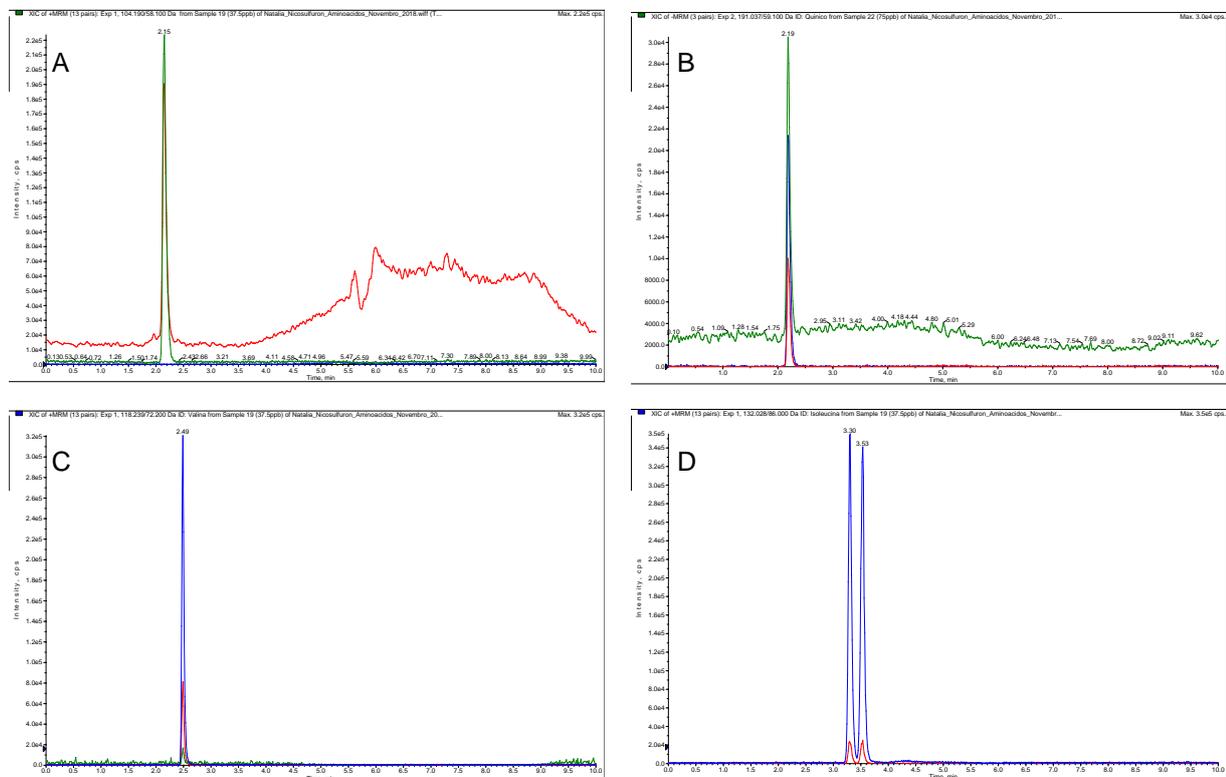


Figura 7 – Cromatograma obtido para o ácido aminobutírico (A), ácido quínico (B), valina (C) e leucina+isoleucina (D) (37,5 ng ml⁻¹)



3.3 Análise estatística

Os dados obtidos nas avaliações morfológicas e análises de compostos foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$), sendo as médias comparadas pelo teste de tukey ($p \leq 0,05$). Foi realizada análise de correlação entre os teores naturais de ácido aminobutírico e aminoácidos e os teores após a aplicação do herbicida, bem como entre os parâmetros de altura e fitointoxicação das plantas.

Os programas utilizados foram o Sisvar® (versão 5.6) e Sigma plot® (versão 12.5). Para todos os parâmetros estabeleceu-se o intervalo de confiança pelo teste t ($p \leq 0,05$), utilizando a equação:

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

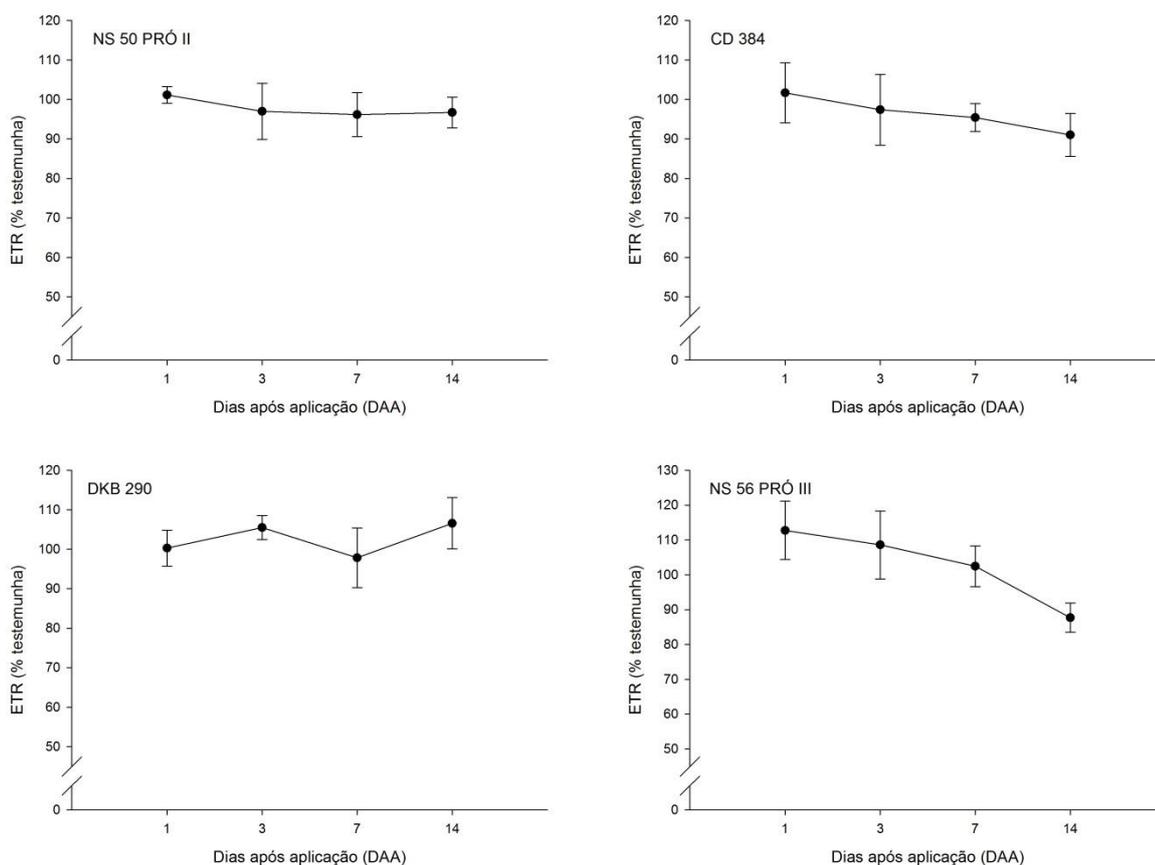
Em que “t” corresponde ao valor de t tabelado ($p \leq 0,05$), o “DP” ao desvio padrão dos dados, “n” o número de repetições.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1 - Épocas de coleta para determinação do ácido aminobutírico

O monitoramento da taxa de transporte de elétrons (ETR) nos quatro híbridos de milho foi realizado em períodos de até 14 dias após a aplicação do herbicida nicosulfuron, e permitiu identificar o comportamento dos materiais. Dentre os híbridos utilizados, o NS 50 PRÓ II e o DKB 290 apresentaram valores de ETR próximos à testemunha (Figura 8).

Figura 8 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 1, 3, 7 e 14 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron, em híbridos de milho no estágio fenológico V3



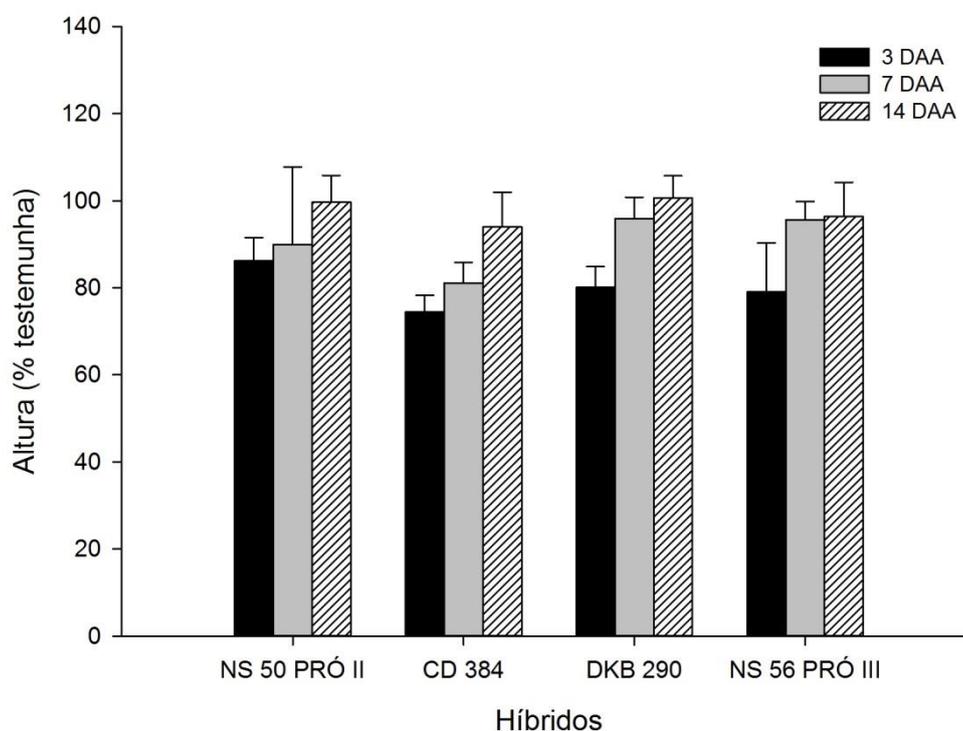
- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$).

Para os híbridos NS 56 PRÓ III e CD 384, de maneira geral, houve redução dos valores de ETR ao longo do período de avaliação, sendo observadas aos 14

DAA as maiores reduções, chegando a valores de aproximadamente 87% em relação à testemunha para o híbrido NS 56 PRÓ III e 90% para o CD 384.

O herbicida nicosulfuron influenciou negativamente o desenvolvimento das plantas de milho em curtos períodos após a aplicação. Os híbridos avaliados apresentaram significativa redução de altura na avaliação realizada aos 3 DAA em relação às suas testemunhas. A maior redução foi observada para o híbrido CD 384, que apresentou valores de 74,48 e 81,12% em relação à testemunha aos 3 e 7 DAA, respectivamente. Na avaliação realizada aos 14 DAA as plantas apresentaram valores de altura mais próximos à testemunha, alcançando entre 93,98 e 100,63%. Esses resultados demonstraram a capacidade de recuperação das plantas de milho à aplicação do nicosulfuron, anulando seus efeitos fitotóxicos (Figura 9).

Figura 9 – Altura de plantas de híbridos de milho (% em relação à testemunha) aos 3, 7 e 14 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V3

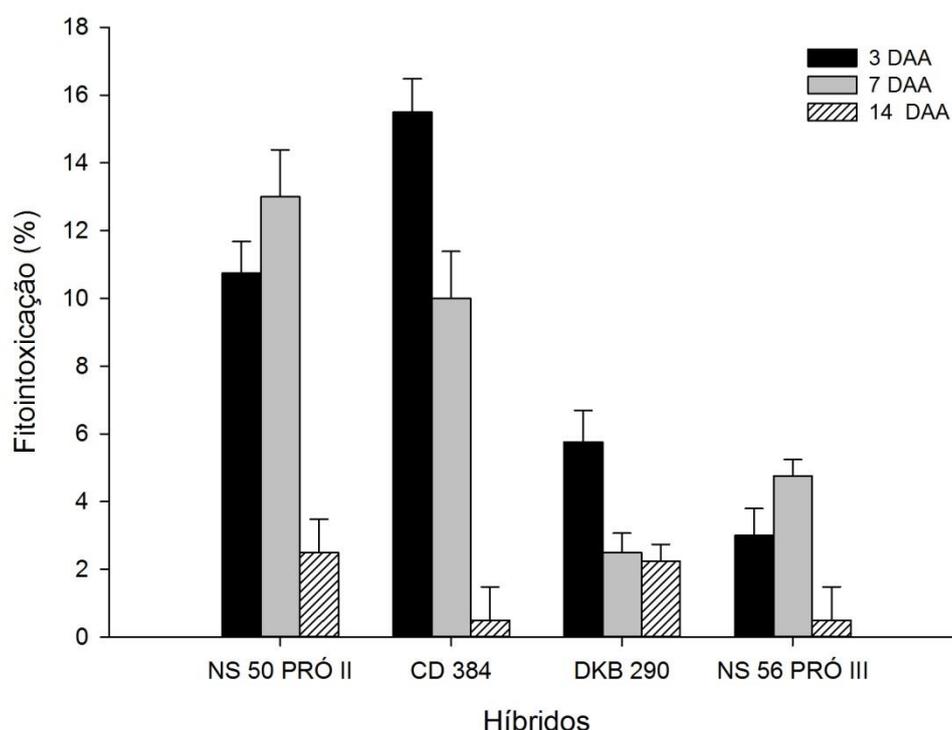


- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$).

As porcentagens de fitointoxicação nos quatro híbridos de milho em diferentes períodos de avaliação estão apresentadas na Figura 10. Os sintomas de

fitointoxicação apresentados pelos híbridos de milho se caracterizam principalmente por clorose nas folhas em desenvolvimento. Guerra et al. (2010) observaram clorose e enrugamento das folhas novas em expansão em plantas de milho no estágio V3 aos três dias após a aplicação de nicosulfuron. No entanto Spader e Vidal (2001) não encontraram injúrias evidentes após a aplicação do herbicida nas doses de 60 e 80 g i.a. ha⁻¹ no mesmo estágio vegetativo.

Figura 10 – Porcentagem de fitointoxicação em híbridos de milho aos 3, 7 e 14 dias após a aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V3



- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$).

Pode-se observar que apenas os híbridos NS 50 PRÓ II e CD 384 apresentaram valores acima de 10% de fitointoxicação (11 e 15%, respectivamente) no primeiro período de avaliação, demonstrando maior sensibilidade à aplicação do nicosulfuron quando comparados com os demais híbridos (abaixo de 6%).

Na avaliação realizada aos 7 DAA os híbridos NS 50 PRÓ II e NS 56 PRÓ III apresentaram sintomas mais pronunciados de fitointoxicação quando comparados à primeira avaliação. No entanto, para todos os híbridos estudados observou-se a

tendência de recuperação das injúrias causadas pelo nicosulfuron na avaliação realizada aos 14 DAA em que o máximo de fitointoxicação foi de 2,5%.

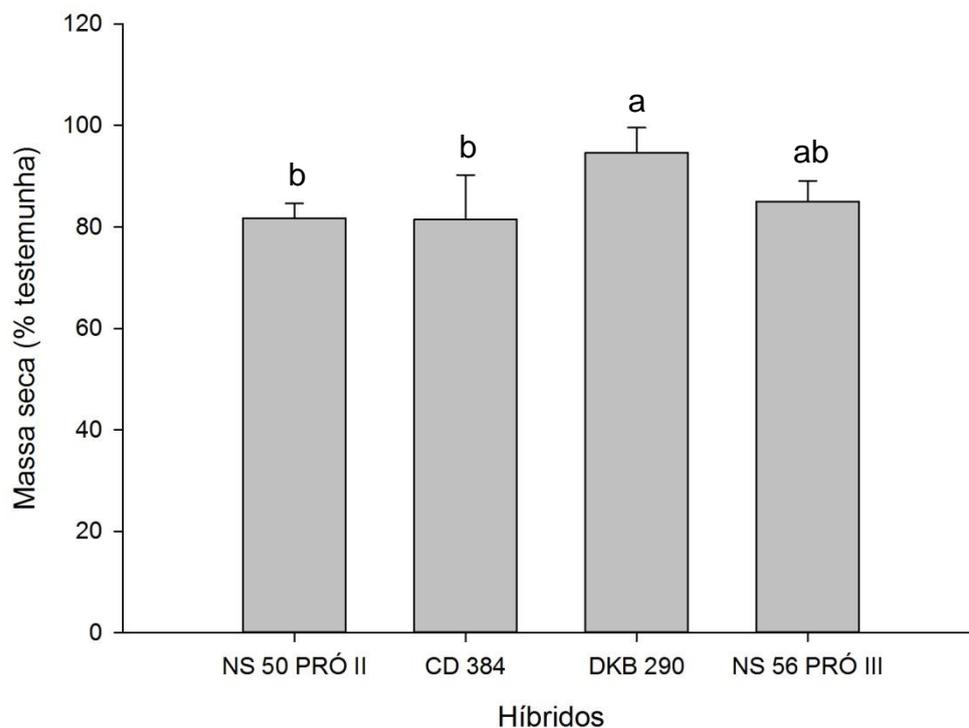
Contiero (2009) aplicando nicosulfuron nas doses de 30, 60 e 140 g i.a ha⁻¹ nos híbridos de milho AS 1548, AS 15 45, S2 709, AS 32, AS 3466 e AS 15 33 observou aos 7 DAA leves alterações foliares nas plantas, caracterizadas por descoloração e deformações, principalmente nas maiores doses do herbicida. A partir dos 21 DAA as plantas se recuperaram e os sintomas desapareceram de maneira uniforme para todos os híbridos. Resultados semelhantes foram observados por López-Ovejero et al. (2003), que relataram sintomas de clorose nas plantas de milho aplicadas com nicosulfuron (40 g i.a. ha⁻¹) apenas aos 3 DAA, com plena recuperação das plantas aos 7 DAA.

Os resultados de fitointoxicação permitiram diferenciar os níveis de sensibilidade dos híbridos ao herbicida, embora não tenham sido observadas injúrias visuais muito acentuadas.

A massa seca da parte aérea em relação à testemunha apresentada na Figura 11 permitiu diferenciar o crescimento e desenvolvimento do híbrido DKB 290 em relação, principalmente, ao NS 50 PRÓ II e CD 384. Esse híbrido apresentou valor de 94,61% de massa seca em relação à sua testemunha. As maiores reduções nos valores de massa seca foram observadas para os híbridos NS 50 PRÓ II e CD 384 (18,25 e 18,54%, respectivamente), que não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Ainda de acordo com os resultados de massa seca das plantas de milho, o híbrido NS 56 PRÓ III teve um comportamento intermediário não diferindo estatisticamente dos demais.

A análise em conjunto dos parâmetros de altura, fitointoxicação e massa seca das plantas possibilitou distinguir diferentes níveis de sensibilidade dos quatro híbridos à aplicação de nicosulfuron. O híbrido CD 384 foi considerado o mais sensível e o híbrido DKB 290 o mais tolerante, sendo esses selecionados para a determinação do ácido aminobutírico e dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina.

Figura 11 - Massa seca (% em relação à testemunha) de híbridos de milho aos 14 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V3



F = 4,60*, CV (%) = 6,69. *significativo a $p \leq 0,05$. Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

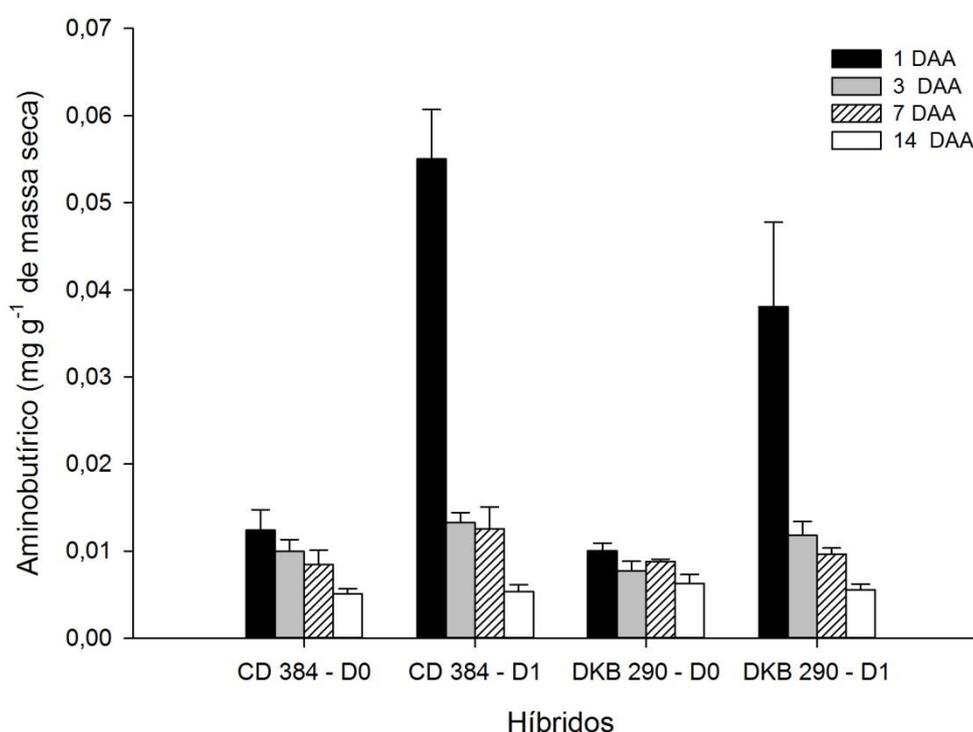
A análise dos teores de ácido aminobutírico nas plantas dos híbridos de milho selecionados permitiu identificar o máximo acúmulo na coleta realizada um dia após a aplicação de nicosulfuron para ambos os híbridos, havendo drástica redução desses teores nas avaliações de 3, 7 e 14 DAA (Figura 12). Para o híbrido CD 384 a aplicação de nicosulfuron resultou em valores de aminobutírico de 0,055; 0,013; 0,012 e 0,006 mg g ms⁻¹ e para o híbrido DKB 290 os teores foram de 0,038; 0,012; 0,009 e 0,005 mg g ms⁻¹ nas avaliações de 1, 3, 7 e 14 DAA, respectivamente.

Desta forma, o melhor período de coleta para determinação do ácido aminobutírico foi considerado um dia após aplicação de nicosulfuron, sendo esse o período padronizado para o segundo experimento realizado.

Em experimento realizado por Li e Wang (2005), o teor do ácido 2-aminobutírico em plantas de *Brassica rapa* tratadas com o herbicida bensulfuron aumentou rapidamente dentro de um período de três horas após a aplicação, atingindo nível máximo entre 6 e 12 horas e permanecendo com níveis elevados até 72 horas após a aplicação. No período de 24 horas após a aplicação do herbicida as

plantas não apresentaram injúrias visíveis e houve grande aumento no teor de aminobutírico. Assim os autores concluíram que este ácido pode ser utilizado como indicador químico, importante para a rápida detecção da ação de herbicidas inibidores da ALS nessas plantas.

Figura 12 – Teor do ácido aminobutírico (mg g^{-1} de massa seca) em dois híbridos de milho aos 1, 3, 7 e 14 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V3



- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$). D0 = tratamento testemunha; D1 = tratamento aplicado com a dose $120 \text{ g i.a. ha}^{-1}$.

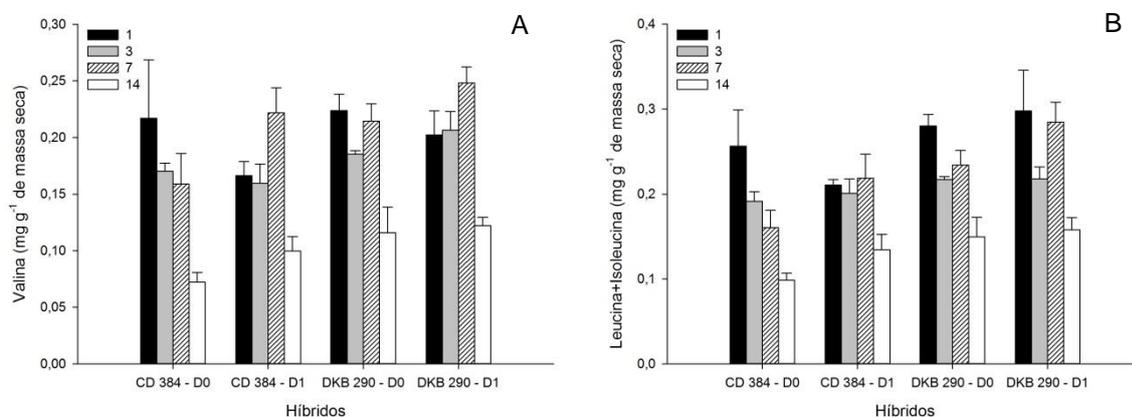
No período de 1 DAA também foi possível observar diferenças entre os teores de aminobutírico nas plantas aplicadas com nicosulfuron e suas respectivas testemunhas para ambos os híbridos. Para o híbrido CD 384 o teor de aminobutírico na testemunha foi de $0,012 \text{ mg g ms}^{-1}$, enquanto que nas plantas tratadas foi de $0,055 \text{ mg g ms}^{-1}$, representando um aumento de 343%. Já para o híbrido DKB 290, considerado mais tolerante, os valores na testemunha e na dose foram de 0,010 e $0,038 \text{ mg g ms}^{-1}$, respectivamente, mostrando um incremento de 280% (Figura 12).

Para os teores dos aminoácidos valina e leucina+isoleucina não foi observado o mesmo comportamento do ácido aminobutírico, de decréscimo constante ao longo

dos períodos de coleta (Figura 13). Para os teores de valina nos híbridos aplicados com nicosulfuron, verificou-se o máximo de acúmulo na coleta realizada aos 7 DAA, enquanto que para as testemunhas dos híbridos a maior concentração do aminoácido ocorreu na coleta de 1 DAA.

Na primeira coleta, 1 DAA, o teor de valina no híbrido CD 384 aplicado correspondeu à aproximadamente 77% em relação à sua respectiva testemunha, enquanto que para o híbrido DKB 290 essa relação foi de 90%, representando menor redução dos teores de valina após a aplicação do herbicida para o híbrido considerado tolerante. Nas avaliações aos 7 e 14 DAA os teores de valina, para ambos os híbridos, nas plantas aplicadas com nicosulfuron foram maiores que os teores encontrados nas testemunhas (Figura 13A).

Figura 13 – Teores dos aminoácidos valina (A) e leucina+isoleucina (B) em dois híbridos de milho aos 1, 3, 7 e 14 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V3



- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$). D0 = tratamento testemunha; D1 = tratamento aplicado com a dose de 120 g i.a. ha⁻¹.

Além disso, os teores naturais de valina, ou seja, aqueles encontrados nas plantas sem aplicação do herbicida foram maiores no híbrido DKB 290 ao longo dos períodos de avaliação, quando comparado com os teores do híbrido CD 384. Para o híbrido CD 384 foram encontrados teores de 0,217; 0,170; 0,159 e 0,072 mg g ms⁻¹ nas coletas de 1, 3, 7 e 14 DAA, respectivamente. Para o híbrido DKB 290 esses teores foram de 0,224; 0,185; 0,214; 0,116 mg g ms⁻¹, demonstrando que o teor natural de valina no híbrido DKB 290 foi 3,15; 8,85; 34,90 e 60,83% maior que no híbrido CD 384, nas avaliações de 1, 3, 7 e 14 DAA, respectivamente.

Em relação aos aminoácidos leucina+isoleucina os maiores teores foram observados na coleta realizada um dia após a aplicação (Figura 13B). Nessa primeira coleta, o teor de leucina+isoleucina na testemunha do híbrido CD 384 foi de $0,257 \text{ mg g ms}^{-1}$ e no híbrido DKB 290 foi de $0,280 \text{ mg g ms}^{-1}$, representando 9% a mais no teor natural de leucina+isoleucina no híbrido DKB 290 quando comparado ao híbrido CD 384.

Na coleta de 3 DAA o híbrido CD 384 apresentou teor de $0,192 \text{ mg g ms}^{-1}$ enquanto o teor no híbrido DKB 290 foi de $0,217 \text{ mg g ms}^{-1}$, havendo nesse último 13,47% a mais de leucina+isoleucina. Na avaliação de 7 DAA os teores nos híbridos CD 384 e DKB 290 foram de $0,160$ e $0,234 \text{ mg g ms}^{-1}$, respectivamente, representando 45,98% a mais desses aminoácidos no híbrido considerado mais tolerante. No último período de coleta essa porcentagem aumentou para 52,09% sendo os teores de leucina+isoleucina de $0,098$ e $0,157 \text{ mg g ms}^{-1}$, nos híbridos CD 384 e DKB 290, respectivamente.

Desse modo, foi possível afirmar que para esse experimento a rota de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada foi mais ativa no híbrido DKB 290. Tal comportamento pode ser atribuído ao maior teor natural de aminoácidos nas plantas, que refletiu nas análises de crescimento realizadas nas quais o híbrido mostrou-se mais tolerante à aplicação de nicosulfuron.

4.2 Experimento 2 - Sensibilidade de híbridos de milho ao nicosulfuron em dois estádios fenológicos

4.2.1 Taxa de transporte de elétrons e análise de crescimento

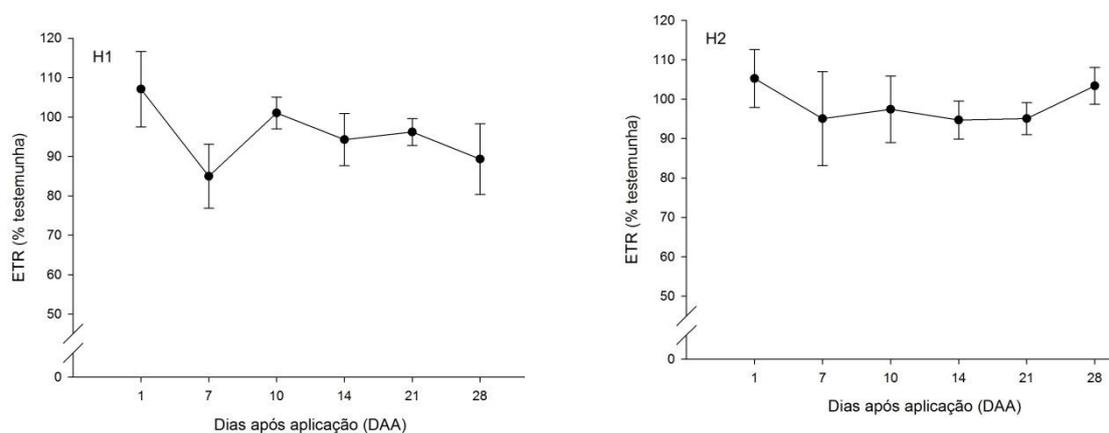
Estudos demonstraram que a fluorescência da clorofila pode ser utilizada para detectar mudanças fotossintéticas em diversas espécies de plantas que estão sob estresse causado por herbicidas (ZHAO et al., 2018). As interferências decorrentes da aplicação de herbicidas no metabolismo das plantas, mesmo que ocorram em reações metabólicas não diretamente envolvidas no metabolismo fotossintético, foram detectadas através de mudanças consideráveis nos parâmetros de

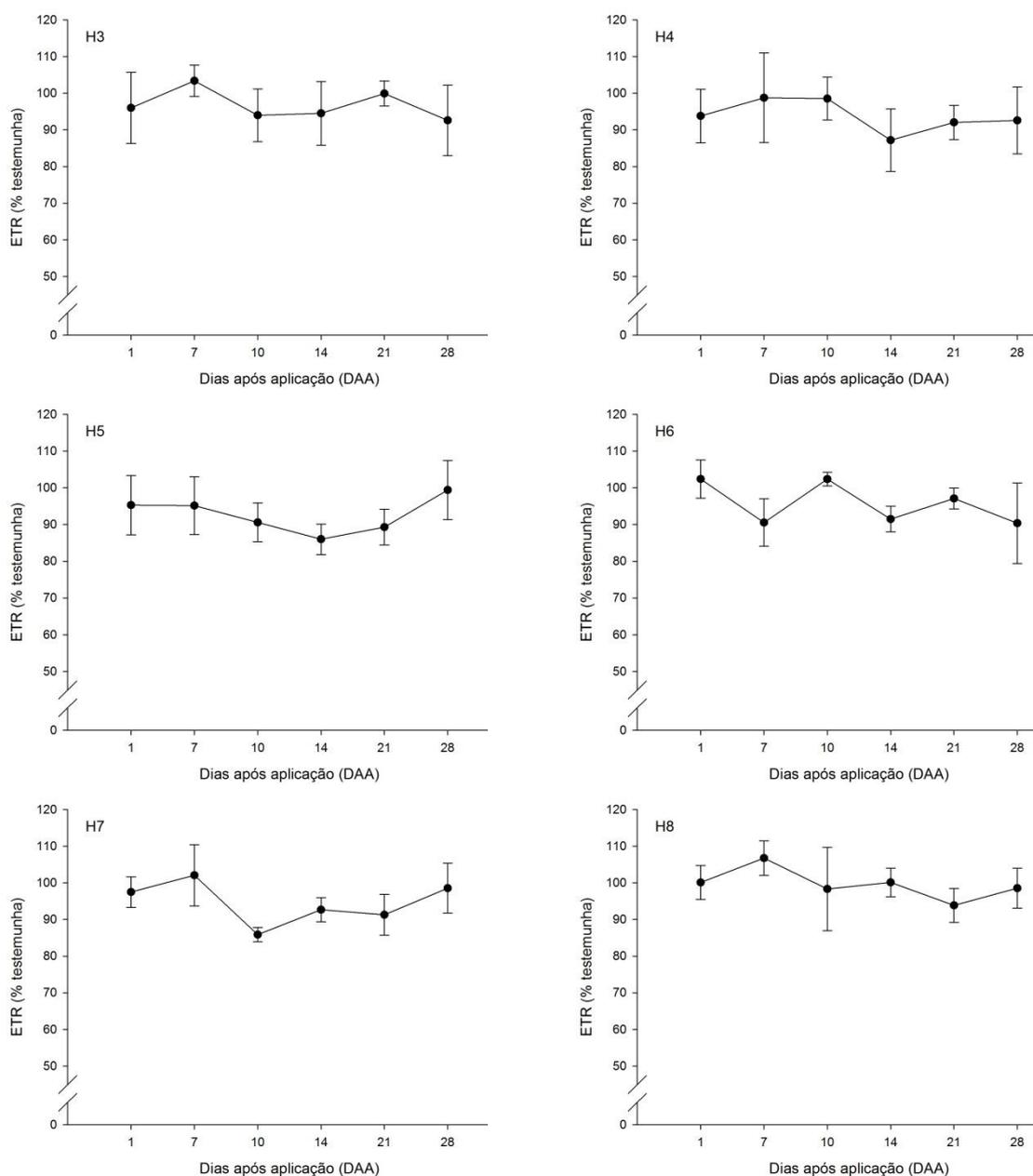
fluorescência, antes que efeitos visuais no crescimento de plantas pudessem ser observados (BARBAGALLO et al., 2003).

Segundo Zhou et al. (2007) a morte das plantas com a aplicação de herbicidas inibidores da ALS também pode ocorrer devido a alguns efeitos secundários desses produtos, como por exemplo, distúrbios no sistema de transporte da fotossíntese. Embora a fotossíntese não seja considerada um mecanismo primário de ação dos herbicidas inibidores da ALS, mudanças nas respostas de fluorescência da clorofila foram observadas nas plantas tratadas com esses herbicidas (RIETHMULLER-HAAGE et al., 2006). Sendo assim, de acordo com Araldi et al. (2011) é importante que o comportamento da fase inicial da fotossíntese, que é o transporte de elétrons no PSII, seja registrado e isso pode ser feito com o uso de um fluorômetro.

Em relação ao segundo ensaio, a taxa de transporte de elétrons ao longo dos períodos de avaliação, para os oito híbridos de milho aplicados no estágio fenológico V2 pode ser observada na Figura 14. Os híbridos H2 e H8 apresentaram as menores reduções de ETR, com valores muito próximos à testemunha para todos os períodos de avaliação.

Figura 14 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 1, 7, 10, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron, em oito híbridos de milho no estágio fenológico V2





- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$).

O H5 apresentou as maiores reduções de ETR com valores de 90,58; 86,00 e 89,29% em relação à testemunha nas avaliações de 10, 14 e 21 DAA, respectivamente. O H7 apresentou o mesmo comportamento nesses períodos de avaliação, com valores de ETR de 85,86; 92,68 e 91,28% em relação à testemunha. Na última avaliação, esses dois híbridos recuperaram os valores da taxa de transporte de elétrons, praticamente igualando-se a testemunha. Já para o H4 foram verificados menores valores de ETR em relação à testemunha a partir da avaliação de 14 DAA, sendo ele de 87,18% em relação às plantas sem aplicação.

Estudos realizados por Zhao et al. (2018) indicaram que a aplicação do herbicida chlorsulfuron em plantas de milho provocou reduções significativas dos teores de clorofila, representando 49% dos obtidos na testemunha. Os autores concluíram que a fluorescência de clorofila foi um parâmetro útil para avaliar o desempenho fotossintético de plantas sob estresse causado pela toxicidade de chlorsulfuron.

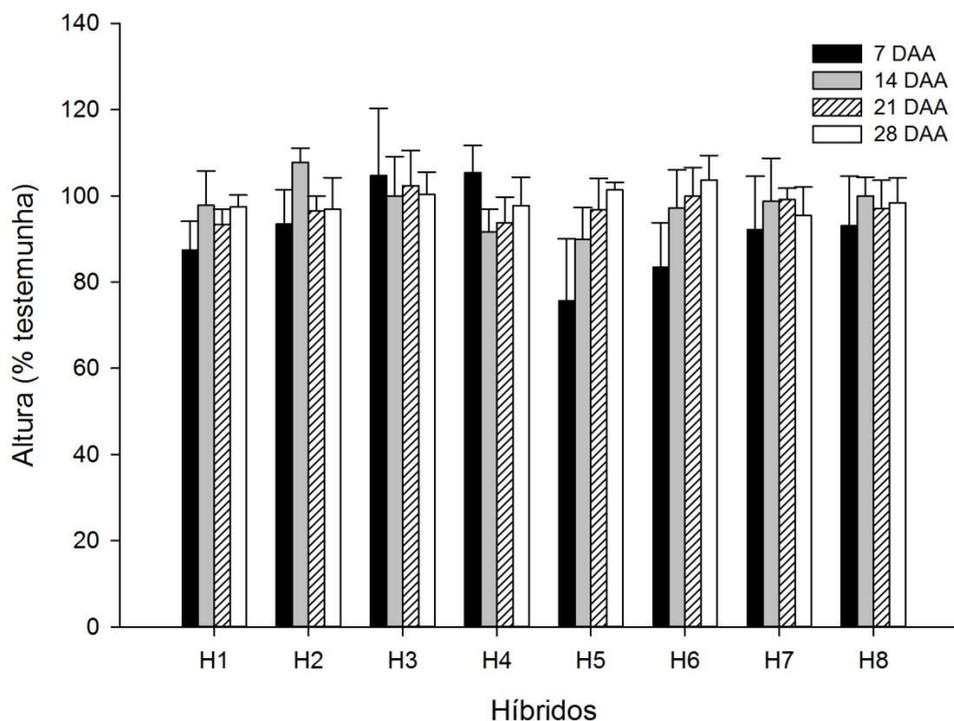
Anésio et al. (2017) após a aplicação de diversos herbicidas em *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria ruziziensis* observaram que aos 21 e aos 30 dias após a aplicação dos herbicidas glyphosate, fluazifop-p-buthyl, mesotrione e nicosulfuron, as plantas de *B. ruziziensis* apresentaram redução de ETR, diferindo significativamente das plantas não aplicadas. Esses herbicidas também afetaram a relação F_v/F_m (fluorescência variável/fluorescência máxima) para as duas espécies estudadas, mostrando que a aplicação desses herbicidas pode resultar em algum efeito na cadeia de transporte de elétrons.

Os híbridos H1, H3 e H6 mostraram na média de todos os períodos de avaliação uma redução na taxa de transporte de elétrons de aproximadamente 5% em relação às suas respectivas testemunhas, havendo alguns períodos onde essa queda foi mais acentuada (Figura 14). Resultados semelhantes foram encontrados por Freitas et al. (2014), que aplicando nicosulfuron em três genótipos de milho pipoca observaram que a razão F_v/F_m não foi afetada pela aplicação desse herbicida.

Pode-se ressaltar que durante o monitoramento da ETR, não houve drásticas reduções nos valores para todos os híbridos estudados, sendo que a diminuição não ultrapassou 20% em relação aos valores encontrados nas testemunhas.

Em relação à altura das plantas pode-se observar que no experimento onde o nicosulfuron foi aplicado nas plantas de milho no estágio fenológico V2 (Figura 15), as reduções mais expressivas ocorreram aos 7 DAA para os híbridos H5 e H6, que apresentaram valores de 75,73 e 83,51% em relação às suas testemunhas, respectivamente. No entanto, ao longo do período de avaliação esses híbridos apresentaram recuperação total de altura, igualando-se às testemunhas aos 28 DAA.

Figura 15 – Altura de plantas de híbridos de milho (% em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V2



- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$).

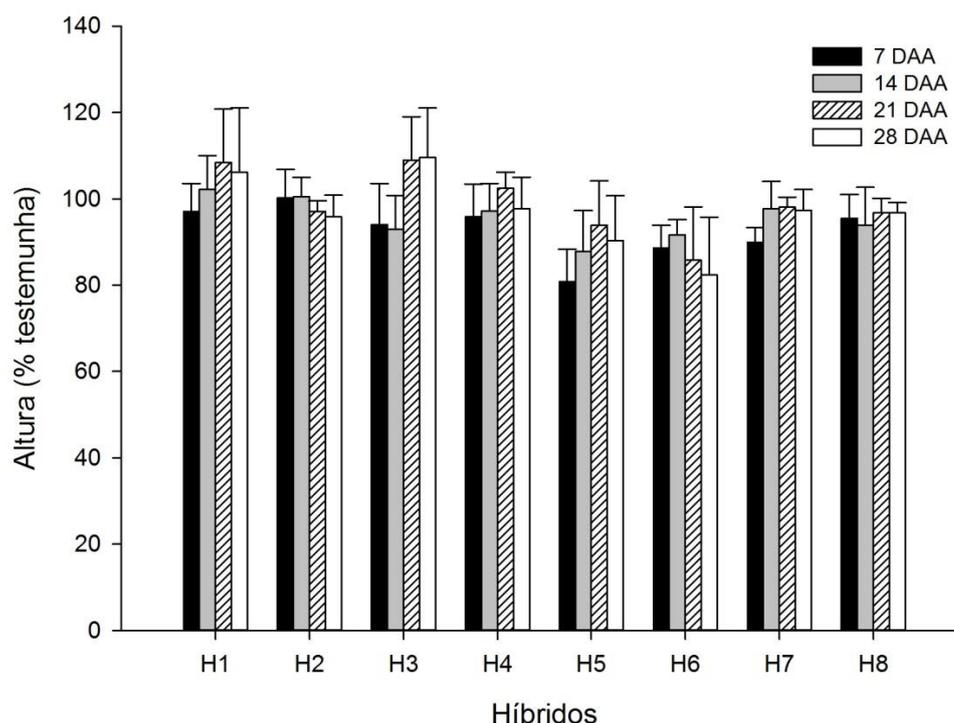
Resultados semelhantes também foram encontrados por Damião Filho, Môro e Taveira (1996), que aplicando nicosulfuron na dose de 80 g i.a. ha⁻¹ em nove híbridos de milho no estágio fenológico V6, observaram reduções significativas na altura dos híbridos AG 106, Br 201, 92HDIQPM e CMS 473 em relação às plantas não aplicadas. Na avaliação realizada no período de florescimento, com exceção do híbrido AG 106, os híbridos apresentaram recuperação no crescimento, igualando-se estatisticamente às respectivas testemunhas.

Os híbridos H2, H3, H7 e H8 apresentaram, de maneira geral, valores próximos aos encontrados em suas respectivas testemunhas e, com exceção do H3, os menores valores de altura ocorreram na avaliação de 7 DAA com reduções de aproximadamente 7%. Para o H1 a maior interferência do herbicida na altura das plantas foi observada na primeira avaliação, com redução de 12%. Já em relação ao H4, as plantas apresentaram redução desse parâmetro a partir da avaliação de 14 DAA (redução de 8%), apresentando leve recuperação aos 28 DAA (Figura 15).

Em ensaio realizado por Cavalieri et al. (2008), o herbicida nicosulfuron foi aplicado nas doses de 30 e 60 g i.a. ha⁻¹ em cinco híbridos de milho que se encontravam entre 4 a 6 folhas completamente expandidas. Os autores relataram aos 7 DAA na maior dose, os híbridos AG 7000, B 761, B 551 e Ocepar 705 apresentaram reduções significativas de altura, enquanto que na avaliação de 14 DAA a redução do crescimento foi significativa apenas para o híbrido B761, indicando recuperação dos demais híbridos ao longo do ciclo da cultura.

Quando o nicosulfuron foi aplicado no estágio V6 de desenvolvimento das plantas de milho, comportamentos similares ao experimento anterior foram observados (Figura 16). O H5 mostrou-se novamente o mais sensível à aplicação do herbicida com reduções de 19; 12; 6 e 9,5% quando comparado à testemunha aos 7, 14, 21 e 28 DAA, respectivamente. No entanto, para o híbrido H6 não houve recuperação no crescimento das plantas, sendo observadas aos 21 e 28 DAA reduções na altura de 14 e 18%, respectivamente, mostrando-se assim mais sensível à aplicação do nicosulfuron do que quando aplicado no estágio V2.

Figura 16 - Altura de plantas de híbridos de milho (% em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V6



- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$).

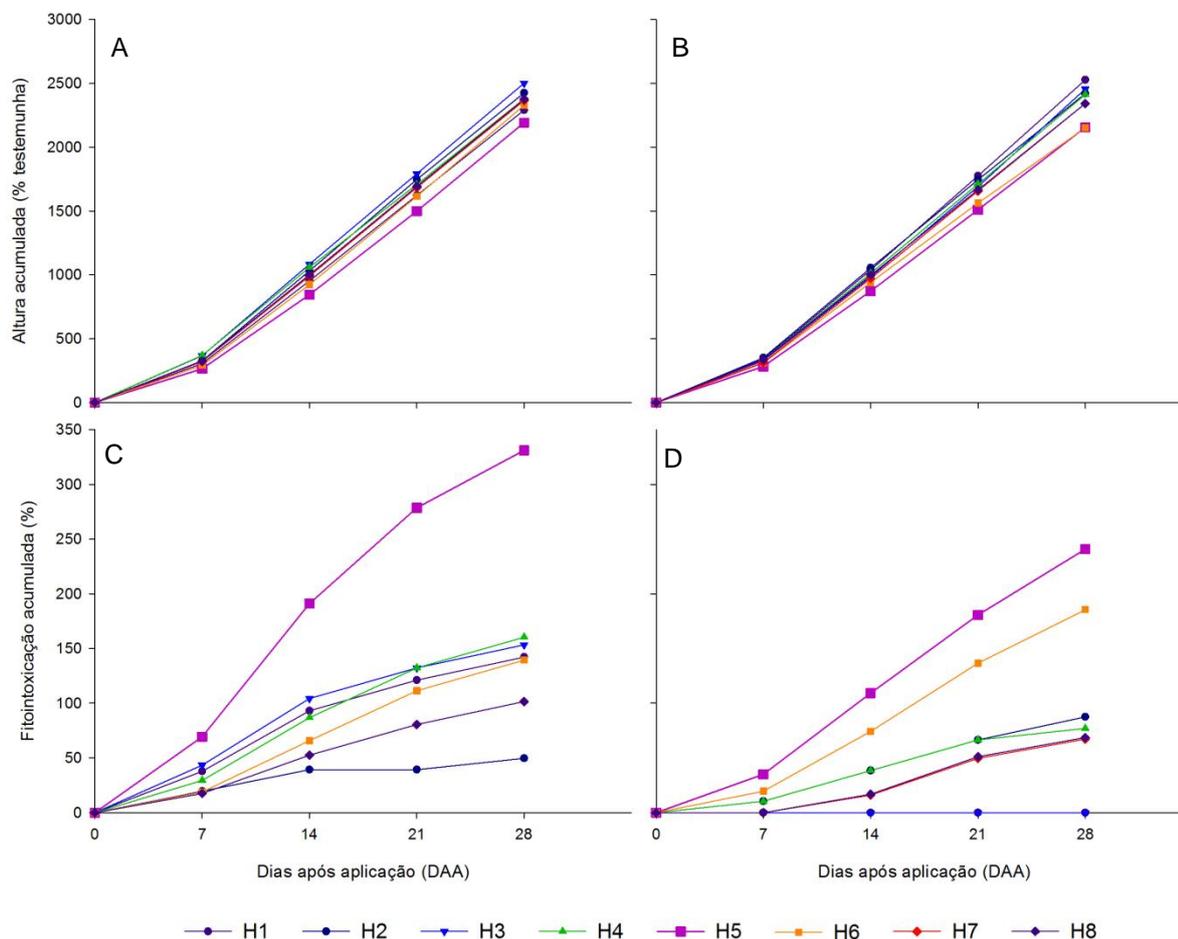
Aos 7 DAA o híbrido H3 e o híbrido H7 apresentaram reduções em relação a testemunha de 6 e 10%, respectivamente. Contudo, na última avaliação realizada já haviam recuperado o crescimento, praticamente igualando-se às testemunhas. Os demais híbridos não apresentaram reduções expressivas de altura em todos os períodos de avaliação.

Em experimento realizado por Cavalieri et al. (2012) o nicosulfuron nas doses de 0; 17,5; 35; 70 e 140 g i.a. ha⁻¹ foi aplicado no híbrido de milho pipoca A448 White nos estádios fenológicos V3, V5 e V7. Os autores observaram que as plantas aplicadas no estágio fenológico V3 não apresentaram diferenças de altura quando comparadas à testemunha. Já as plantas que receberam aplicação do herbicida no estágio V7 de desenvolvimento apresentaram menores valores de altura quando comparadas às plantas aplicadas nos estádios V3 e V5. Para a maior dose de nicosulfuron, as plantas apresentaram reduções mais expressivas no crescimento à medida que o herbicida foi aplicado em estádios mais avançados de desenvolvimento, mostrando-se assim menos seletivo à cultura nesses estádios.

Em contrapartida, no estudo realizado por Contiero (2009) no qual o nicosulfuron foi aplicado nas doses de 30, 60 e 120 g i.a. ha⁻¹ em seis híbridos de milho, os autores observaram que apesar de alguns híbridos terem sido mais sensíveis à aplicação, essa sensibilidade não refletiu na altura das plantas.

Ainda em relação ao parâmetro altura, analisando a Figura 17A, foi possível observar que o híbrido H5 apresentou os menores valores de altura acumulada em relação a sua testemunha para o experimento aplicado no estágio fenológico V2, enquanto que o H3 foi o menos afetado pelo herbicida, apresentando os maiores valores de altura acumulada ao longo dos períodos de avaliação. Quando os híbridos de milho foram aplicados no estágio V6 de desenvolvimento, o mesmo comportamento foi observado para o híbrido H5, no entanto para esse experimento o H6 também exibiu valores mais baixos de altura acumulada (Figura 17B).

Figura 17 - Altura acumulada em híbridos de milho (% em relação à testemunha) no estágio fenológico V2 (A) e V6 (B) e valores de fitointoxicação acumulada no estágio fenológico V2 (C) e V6 (D) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron



Em relação aos valores de fitointoxicação acumulada, pode-se observar que tanto para a aplicação realizada no estágio V2 quanto no estágio V6 de desenvolvimento das plantas, houve diferentes níveis de intoxicação entre os híbridos estudados, de maneira geral foram observados sintomas de clorose nas folhas em expansão, principalmente nos primeiros períodos de avaliação (7 e 14 DAA).

Quando a aplicação foi realizada no estágio V2, o híbrido H5 se mostrou mais sensível à ação do herbicida (Figura17C) apresentando valores de fitointoxicação próximos a 20%, no entanto, com o desenvolvimento da cultura esses sintomas diminuíram para 5% na avaliação realizada aos 28 DAA. Já o H2 foi mais tolerante

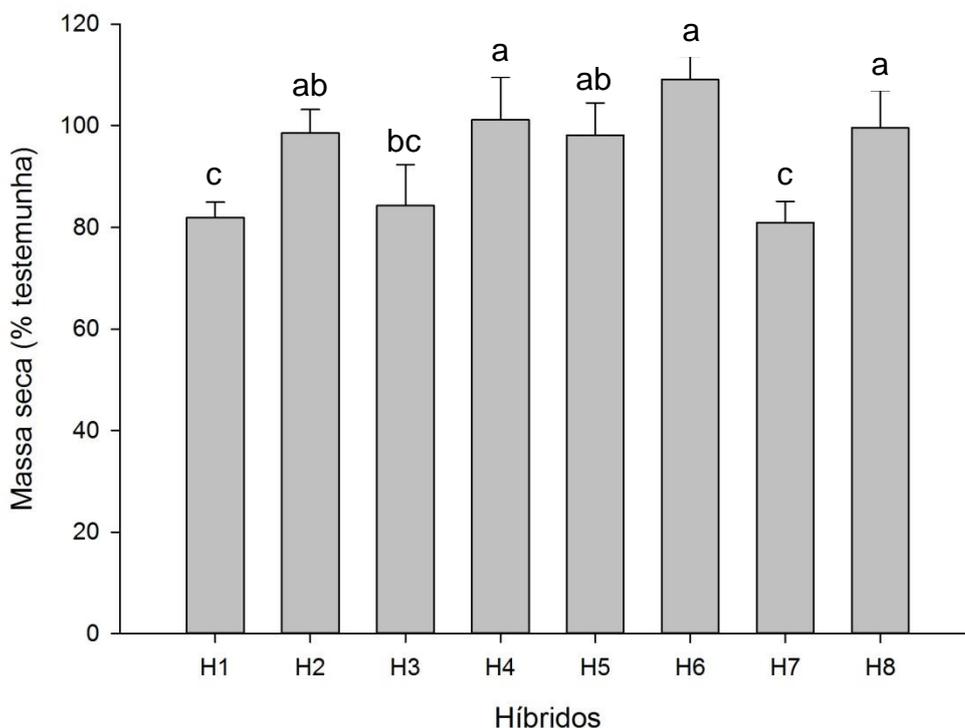
ao nicosulfuron com valores de fitointoxicação abaixo de 6% em todos os períodos de avaliação.

Para a aplicação realizada no estágio V6 de desenvolvimento o híbrido H5 apresentou comportamento similar, mostrando-se mais sensível à aplicação de nicosulfuron em relação aos demais híbridos, no entanto a fitointoxicação, neste caso, não ultrapassou 12%. O H6 também apresentou valores mais elevados de fitointoxicação sendo que as maiores injúrias foram observadas na avaliação de 14 DAA. Nenhum sintoma decorrente da aplicação do herbicida foi observado nos híbridos H1 e H3 durante todo o período de condução do experimento (Figura 17D).

As avaliações de fitointoxicação permitiram diferenciar o nível de sensibilidade para alguns híbridos, mesmo com baixas porcentagens de injúrias (máximos de 20%), caracterizada por clorose leve causada pela aplicação do dobro da dose recomendada. Injúrias mais severas em híbridos de milho após a aplicação de nicosulfuron foram relatadas por Môro e Damião Filho (1999) que aos 7 DAA observaram sintomas de clorose e enrugamento das lâminas das folhas centrais, que evoluíram para o centro da lâmina foliar aos 14 DAA. Nesse período também surgiram sintomas de enrolamento das extremidades das folhas, porém os sintomas se amenizaram durante o desenvolvimento da cultura, o que os autores atribuem a uma possível degradação metabólica do herbicida.

A massa seca da parte aérea dos híbridos de milho aplicados no estágio fenológico V2 mostra que os híbridos H1 e H7, quando comparados com suas respectivas testemunhas, apresentaram reduções no crescimento de 18,12 e 19,10%, respectivamente (Figura 18). Os híbridos mais tolerantes à ação do herbicida foram H4, H6 e H8 que apresentaram desenvolvimento muito similar ao observado nas testemunhas e superior ao H2, H3 e H5.

Figura 18 - Massa seca (% em relação à testemunha) de híbridos de milho aos 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V2



F = 11,15**, CV (%) = 7,40. **significativo a $p < 0,01$. Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

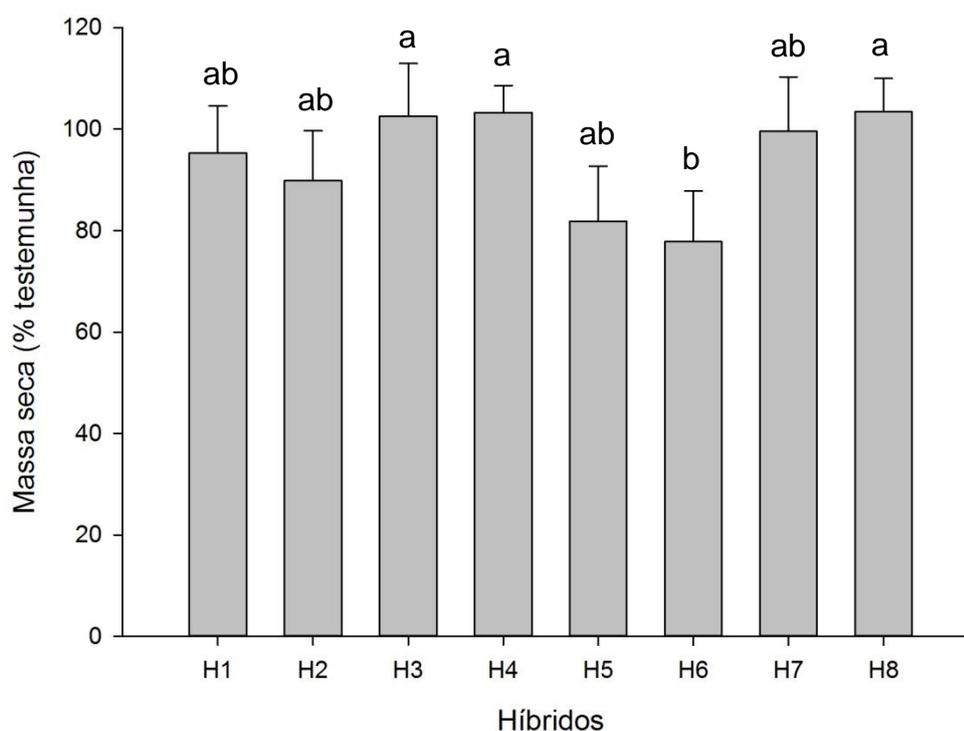
As reduções significativas de altura observadas para o híbrido H5 não refletiram no acúmulo de massa seca aos 28 DAA, pois apesar das plantas terem sofrido os maiores prejuízos da ação do herbicida nos primeiros dias após a aplicação, foram capazes de recuperar o seu desenvolvimento, praticamente igualando-se às testemunhas.

Reduções de massa seca em híbridos de milho aplicados com nicosulfuron também foram observadas por Cavalieri et al. (2008), avaliando 33 híbridos de milho que foram aplicados com as doses de 30 e 60 g i.a. ha⁻¹ do herbicida, os híbridos AG 7000, AG 8021, AS 1570, B 551, B 761, BRS 3150, CD 308, CO 32, Maximus, Ocepar 705 e Tork apresentaram redução significativa do acúmulo de massa seca em ambas as doses, alcançando redução de 45% para o híbrido CD 308 em relação às plantas não aplicadas.

Para o experimento em que a aplicação de nicosulfuron foi realizada no estágio V6 de desenvolvimentos das plantas, o híbrido H6 apesar de ter sido um dos mais tolerantes quando aplicado no estágio V2, reduziu 22,17% de massa seca da

parte aérea em relação a sua testemunha, indicando assim maior sensibilidade desse híbrido à ação do herbicida nesse estágio fenológico (Figura 19). Grandes reduções no desenvolvimento das plantas desse híbrido foram refletidas em menores valores de altura nos últimos períodos de avaliação (21 e 28 DAA), elevada fitointoxicação e menor acúmulo de massa quando comparado aos demais híbridos estudados. O híbrido H5 também teve o crescimento afetado pela ação do herbicida, com redução de 18,20% no acúmulo de massa quando comparado à testemunha (Figura 19).

Figura 19 - Massa seca (% em relação à testemunha) de híbridos de milho aos 28 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V6



F = 4,47**, CV (%) = 11,28. **significativo a $p < 0,01$. Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Nesse experimento os híbridos H3, H4 e H8 se mostraram os mais tolerantes ao herbicida, se destacando dos demais. As diferenças de fitointoxicação observadas, conforme discutido anteriormente, e que poderiam prejudicar o crescimento das plantas, não se refletiram no acúmulo de massa seca das plantas aos 28 DAA, exceto para o híbrido H6.

4.2.2 Teores de clorofila

Nas tabelas 4 e 5 encontram-se os valores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides para oito híbridos de milho após a aplicação de nicosulfuron nos estádios V2 e V6. No experimento realizado no estádio V2 de desenvolvimento das plantas a aplicação do herbicida não reduziu os teores de clorofila *a*, *b* e total para todos os híbridos estudados, sendo verificado em alguns híbridos teores maiores para as plantas que receberam a aplicação do herbicida do que para as testemunhas. Resultados similares foram encontrados por Jakelaitis et al. (2005) que realizando aplicação de nicosulfuron no milho pipoca UFVM2 não observou diferenças significativas entre o teor relativo de clorofila total na testemunha e aquele apresentado pelas plantas aplicadas com o herbicida.

Em relação aos teores de carotenoides, a interação híbrido e dose não foi significativa, não havendo também significância do fator dose (Tabela 4). Foram verificadas diferenças entre os híbridos estudados, independente da aplicação do nicosulfuron, sendo os teores nos híbridos H1, H3, H4 e H6 superiores àqueles observados, principalmente, no H5 e H8.

Quando o herbicida foi aplicado no estádio fenológico V6, a interação híbrido e dose não foi significativa para os teores de clorofila *b* e carotenoides. Além disso, com exceção dos híbridos H1 e H6, também não houve diferença significativa entre os teores de clorofila *a* e clorofila total encontrados nas testemunhas e nas plantas tratadas, indicando assim que a ação do herbicida pode não ter afetado o processo fotossintético nesses híbridos (Tabela 5).

Os teores de clorofila e carotenoides nas folhas podem ser um indicativo da ocorrência de estresse causado as planta pela aplicação de herbicidas, por exemplo, uma vez que a clorose normalmente é um dos primeiros sintomas visíveis (CATUNDA et al., 2005). No entanto, mesmo para os híbridos que apresentaram os maiores valores de fitointoxicação aos 7 DAA, as injúrias causadas pela ação do herbicida não se refletiram na redução dos teores de clorofila e carotenoides.

Tabela 4 - Teores de clorofila a, b, total e carotenoides em folhas de oito híbridos de milho aos 7 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V2

| FV | GL | Quadrado Médio | | | |
|-------------|---------------------------------------|----------------|------------------------------------|-----------------|--------------------|
| | | Clorofila a | Clorofila b | Clorofila total | Carotenoides |
| Híbrido (H) | 7 | 265,61** | 93,26* | 446,62** | 28,68** |
| Dose (D) | 1 | 505,58** | 135,01 ^{ns} | 1163,12** | 0,04 ^{ns} |
| H x D | 7 | 128,35** | 97,78* | 414,45** | 3,42 ^{ns} |
| Resíduo | 64 | 34,70 | 33,90 | 124,45 | 2,05 |
| CV (%) | | 7,76 | 16,94 | 10,12 | 14,05 |
| Híbrido | Clorofila a (ug g ⁻¹) | | Clorofila b (ug g ⁻¹) | | |
| | g i.a. ha ⁻¹ | | | | |
| | 0 | 120 | 0 | 120 | |
| H1 | 82,60 Aa | 81,92 ABCa | 32,42 ABCa | 32,71 Aa | |
| H2 | 77,93 ABa | 78,11 ABCa | 43,38 Aa | 35,01 Ab | |
| H3 | 68,60 BCb | 86,13 Aa | 25,23 Cb | 36,84 Aa | |
| H4 | 78,80 ABa | 83,62 ABa | 31,78 BCa | 37,73 Aa | |
| H5 | 60,42 Cb | 73,55 BCa | 28,29 BCb | 35,68 Aa | |
| H6 | 68,13 BCb | 75,61 ABCa | 30,07 BCa | 35,38 Aa | |
| H7 | 77,58 ABa | 76,73 ABCa | 39,73 ABa | 37,71 Aa | |
| H8 | 72,94 ABa | 71,56 Ca | 33,66 ABCa | 34,28 Aa | |
| Híbrido | Clorofila total (ug g ⁻¹) | | Carotenoides (ug g ⁻¹) | | |
| | g i.a. ha ⁻¹ | | | | |
| | 0 | 120 | | | |
| H1 | 115,02 ABCa | 114,63 Aa | 12,20 A | | |
| H2 | 121,32 Aa | 113,12 Aa | 9,25 CD | | |
| H3 | 93,83 CDb | 122,97 Aa | 11,98 A | | |
| H4 | 110,58 ABCDa | 121,35 Aa | 11,16 ABC | | |
| H5 | 88,71 Db | 109,23 Aa | 8,66 D | | |
| H6 | 98,20 BCda | 110,99 Aa | 11,34 AB | | |
| H7 | 117,31 ABa | 114,44 Aa | 9,46 BCD | | |
| H8 | 106,60 ABCDa | 105,85 Aa | 7,58 D | | |

ns: não significativo, *significativo a $p \leq 0,05$ e ** $p < 0,01$. Letras maiúsculas iguais na coluna (híbridos) e minúsculas iguais nas linhas (doses) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 - Teores de clorofila a, b, total e carotenoides em folhas de oito híbridos de milho aos 7 dias após aplicação (DAA) de nicosulfuron no estágio fenológico V6

| FV | GL | Quadrado Médio | | | |
|-------------|----|----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | | Clorofila a | Clorofila b | Clorofila total | Carotenoides |
| Híbrido (H) | 7 | 757,47 ^{**} | 93,87 ^{**} | 1373,32 ^{**} | 39,33 ^{**} |
| Dose (D) | 1 | 3,80 ^{ns} | 0,01 ^{ns} | 4,12 ^{ns} | 8,53 ^{ns} |
| H x D | 7 | 173,95 [*] | 21,56 ^{ns} | 314,31 [*] | 4,21 ^{ns} |
| Resíduo | 64 | 78,10 | 10,40 | 144,10 | 2,47 |
| CV (%) | | 19,44 | 21,53 | 19,84 | 12,88 |

| Híbrido | Clorofila a (ug g ⁻¹) | | Clorofila b (ug g ⁻¹) |
|---------|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|
| | g i.a. ha ⁻¹ | | |
| | 0 | 120 | |
| H1 | 60,46 Aa | 46,93 ABCb | 17,24 AB |
| H2 | 40,68 BCa | 46,48 ABCa | 14,24 BC |
| H3 | 56,52 ABa | 50,91 ABa | 17,57 AB |
| H4 | 38,73 Ca | 41,13 BCa | 13,95 BC |
| H5 | 33,98 Ca | 37,55 BCa | 10,79 C |
| H6 | 49,10 ABCb | 62,27 Aa | 19,28 A |
| H7 | 51,42 ABCa | 48,39 ABa | 15,76 AB |
| H8 | 36,65 Ca | 30,40 Ca | 11,02 C |

| Híbrido | Clorofila total (ug g ⁻¹) | | Carotenoides (ug g ⁻¹) |
|---------|---------------------------------------|------------|------------------------------------|
| | g i.a. ha ⁻¹ | | |
| | 0 | 120 | |
| H1 | 79,68 Aa | 62,19 ABCb | 14,41 A |
| H2 | 53,53 BCda | 62,12 ABCa | 13,65 ABC |
| H3 | 74,67 ABa | 67,91 ABa | 13,30 ABC |
| H4 | 52,43 BCda | 55,33 BCa | 11,82 BCD |
| H5 | 44,12 Da | 48,99 BCa | 10,28 DE |
| H6 | 65,95 ABCDb | 83,98 Aa | 13,89 AB |
| H7 | 68,36 ABCa | 62,96 ABCa | 11,56 CD |
| H8 | 48,73 CDa | 40,36 Ca | 8,70 E |

ns: não significativo, *significativo a $p \leq 0,05$ e ** $p < 0,01$. Letras maiúsculas iguais na coluna (híbridos) e minúsculas iguais nas linhas (doses) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2.3 Determinação dos compostos

Ao analisar os teores internos, externos e totais após a aplicação do herbicida nicosulfuron em diferentes híbridos de milho, nos dois estádios fenológicos, foi possível verificar diferenças significativas entre eles (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de variância dos teores internos, externos e totais de nicosulfuron aplicado em híbridos de milho nos estádios fenológicos V2 e V6

| FV | GL | Quadrado Médio | | | | | |
|---------|----|----------------|----------|--------------|----------|------------|----------|
| | | Teor interno | | Teor externo | | Teor total | |
| | | V2 | V6 | V2 | V6 | V2 | V6 |
| Híbrido | 7 | 0,0005** | 0,0001** | 0,0373** | 0,0043** | 0,0447** | 0,0045** |
| Resíduo | 32 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0021 | 0,0044 | 0,0023 | 0,0004 |
| CV (%) | | 17,71 | 29,80 | 13,80 | 12,71 | 13,03 | 11,49 |

**significativo a $p < 0,01$

Os teores internos, externos e totais de nicosulfuron aplicados nos híbridos de milho no estádio fenológico V2 e V6 podem ser observados na Figura 20. Para todos os híbridos, tanto o teor interno quanto o teor externo do herbicida nas plantas foi expressivamente mais elevado quando a aplicação foi realizada no estádio V2 de desenvolvimento.

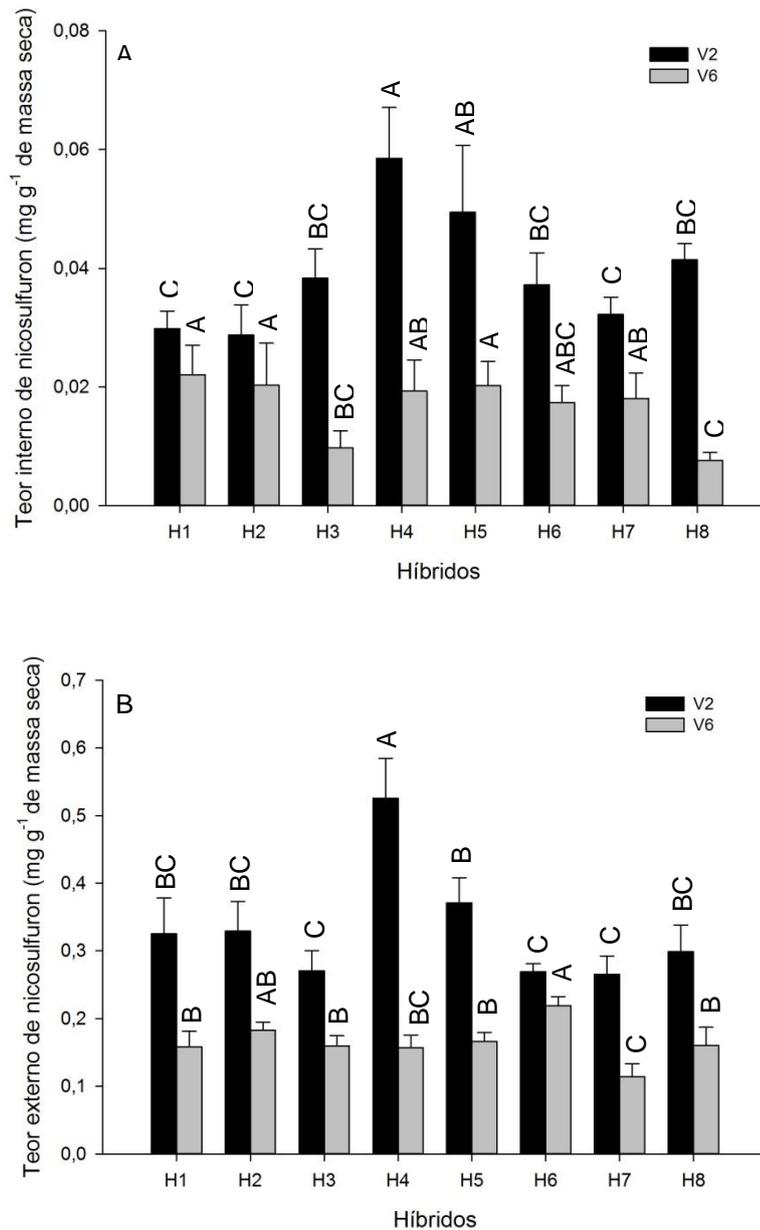
Esses resultados se contrapõem a hipótese de Spader e Vidal (2001), que aplicando nicosulfuron em plantas de milho nos estádios V3, V6 e V9 observaram menor seletividade do herbicida a partir do estádio V6. Os autores relacionaram esse comportamento ao estádio mais avançado de desenvolvimento das plantas, que possuíam maior área foliar, resultando em maior deposição e absorção do herbicida em relação às plantas mais novas.

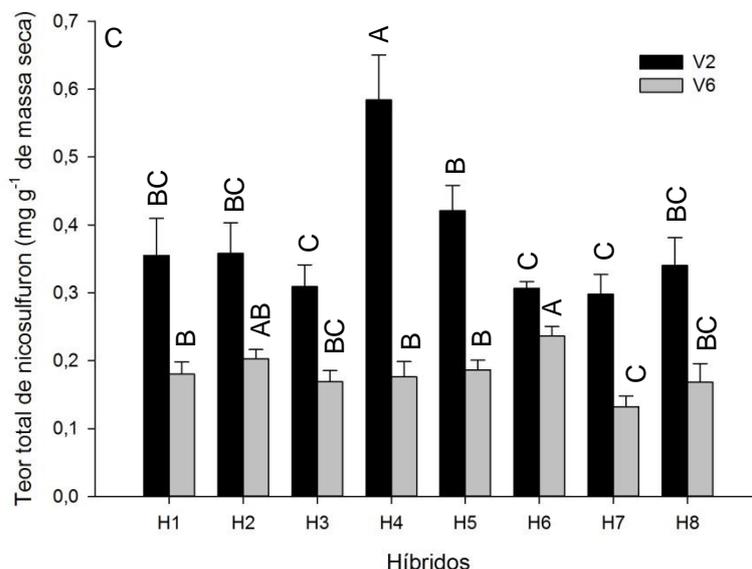
No entanto Merotto Jr. e Fischer (2008) afirmaram que um dos fatores de grande importância para a absorção de herbicidas é a espessura da cutícula, que pode ser influenciada por fatores ambientais como vento, déficit hídrico, temperatura e umidade do ar. Além disso, a composição da cutícula também está relacionada com a absorção do herbicida e pode variar em função da espécie vegetal, do estádio de desenvolvimento e do ambiente.

Existem evidências de que o aumento da espessura da cutícula em plantas mais velhas prejudica a penetração do herbicida, em relação a plantas mais novas (MONQUERO; HIRATA, 2014; SILVA et al., 2007). Chachalis, Reddy e Elmore

(2001) observaram maior concentração de componentes hidrofílicos (72% de álcoois e ácidos, 24% de hidrocarbonetos) em folhas mais novas de *Brunnichia ovata*, já a composição das folhas mais velhas foi relativamente hidrofóbica (23% de álcoois e ácidos, 48% de hidrocarbonetos).

Figura 20 - Teores internos (A), externos (B) e totais (C) de nicosulfuron aplicado em híbridos de milho nos estádios fenológicos V2 e V6





- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$). Letras iguais dentro de cada estágio fenológico não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na Figura 20A pode-se observar que para os híbridos aplicados no estágio fenológico V2, o maior teor interno de nicosulfuron foi encontrado no híbrido H4, seguido pelo H5, correspondendo respectivamente a 0,0585 e 0,0495 mg g ms^{-1} . Já as menores concentrações no interior da planta foram observadas para os híbridos H1, H2 e H7 (0,0298; 0,0287 e 0,0322 mg g ms^{-1} , respectivamente). No entanto os teores internos do herbicida foram muito baixos quando comparados com o teor total encontrado na planta. Quanto a porcentagem que relaciona teor interno/teor total, os híbridos podem ser classificados como: H3>H8>H6>H5>H7>H4>H2>H1 com valores de 12,46; 12,33; 12,17; 11,81; 10,85; 10,01; 8,10 e 8,55%, respectivamente.

No estágio fenológico V6 os maiores teores internos foram observados nos híbridos H1, H2 e H5 (0,0220; 0,0203; 0,0202 mg g ms^{-1}), já o H8 apresentou a menor concentração interna do herbicida (0,0076 mg g ms^{-1}). Em relação a porcentagem que relaciona teor interno/teor total, os híbridos podem ser classificados como: H7>H1>H4>H5>H2>H6>H3>H8 representando 14,19; 12,67; 10,85; 10,84; 9,92; 7,35; 5,73 e 4,59%, respectivamente. Essas baixas concentrações do teor interno em relação ao total de herbicida encontrado na planta podem estar relacionadas a metabolização do nicosulfuron, uma vez que estudos comprovam que em plantas tolerantes como o milho, a maior parte do nicosulfuron absorvido foi metabolizada em menos de 24 horas após a aplicação (CAREY;

PENNER; KELLS, 1997; OBRIGAWITCH; KENYON; KURATLE, 1990).

Em relação ao teor externo de herbicida (Figura 20B), para os dois estádios de desenvolvimento das plantas foram observadas diferenças estatísticas na deposição do herbicida entre os híbridos estudados. As maiores deposições ocorreram para os híbridos H4 e H5 aplicados no estágio fenológico V2. Já quando a aplicação ocorreu no estágio V6 de desenvolvimento das plantas, a maior deposição do herbicida foi observada para o híbrido H6.

Quando as plantas foram aplicadas no estágio fenológico V2 a interação entre os híbridos e as doses do herbicida foi significativa tanto para os ácidos aminobutírico e quínico, quanto para os aminoácidos valina e leucina+isoleucina (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise de variância dos teores do ácido aminobutírico, valina, leucina+isoleucina e ácido quínico em híbridos de milho após aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V2

| FV | GL | Quadrado Médio | | | |
|-------------|----|----------------|----------|--------------------|---------------|
| | | Aminobutírico | Valina | Leucina+Isoleucina | Ácido quínico |
| Híbrido (H) | 7 | 0,0001** | 0,1305** | 0,0005** | 0,0069** |
| Dose (D) | 1 | 0,0025** | 0,3982** | 0,0008** | 0,0016** |
| H x D | 7 | 0,0001** | 0,0213* | 0,0001** | 0,0010** |
| Resíduo | 64 | 0,0000 | 0,0079 | 0,0000 | 0,0002 |
| CV (%) | | 19,82 | 7,12 | 4,68 | 15,20 |

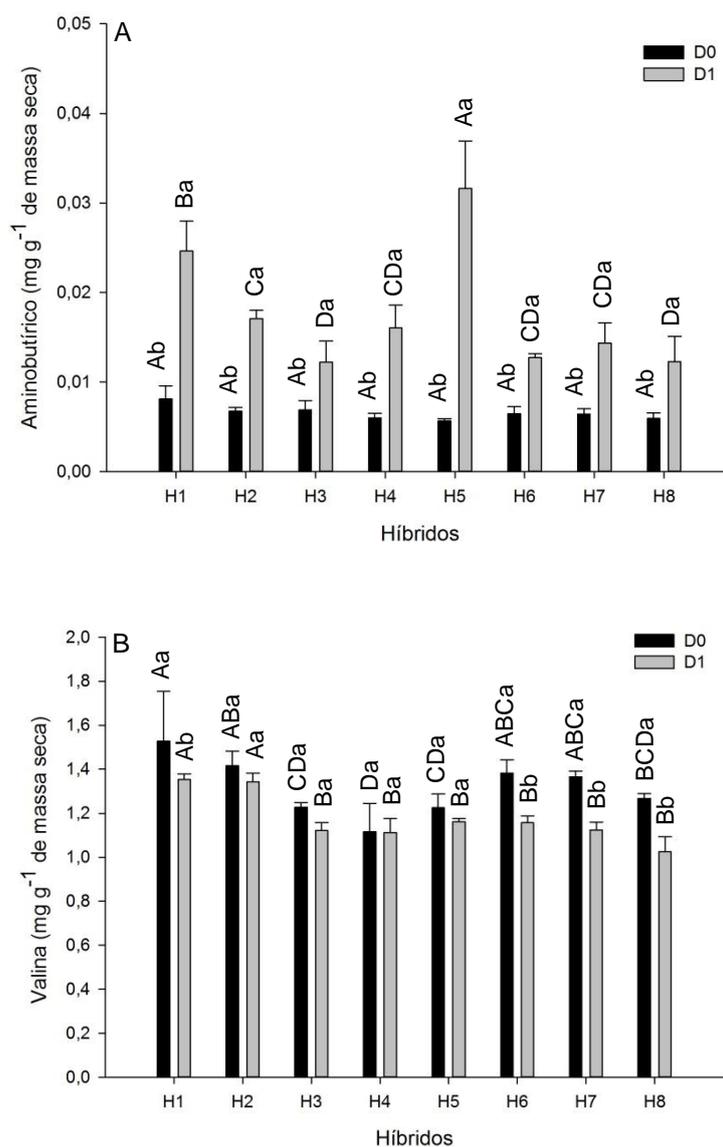
*significativo a $p \leq 0,05$ e a ** $p < 0,01$

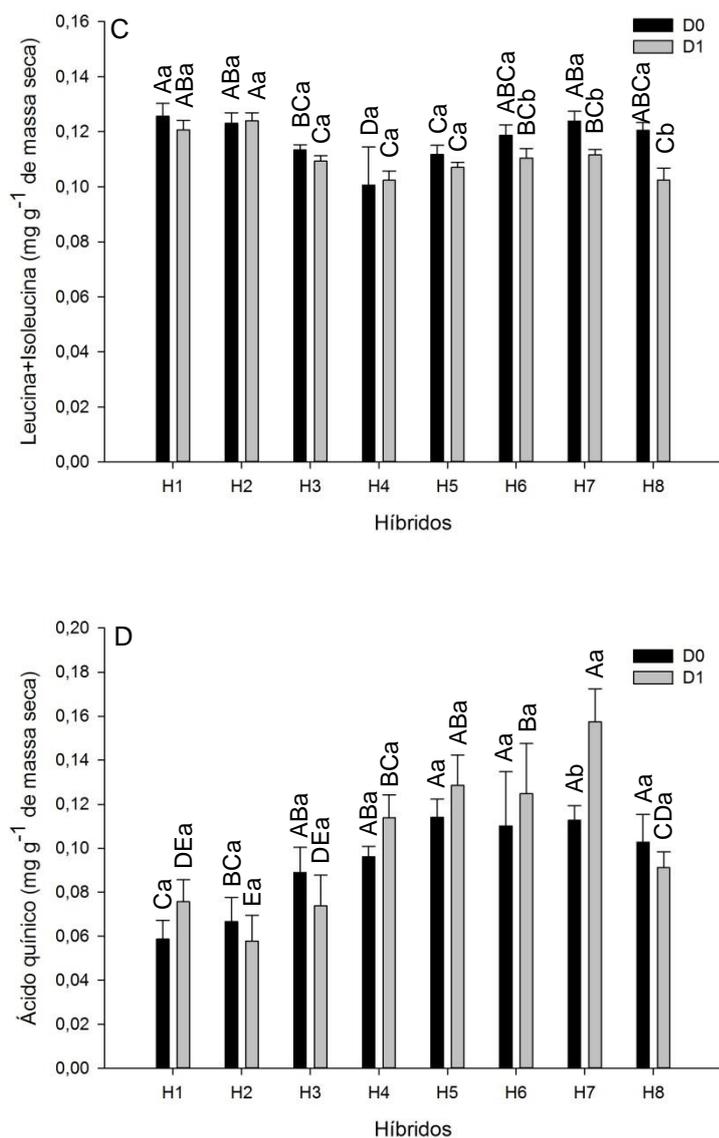
Para todos os híbridos os teores do ácido aminobutírico foram significativamente maiores nas plantas que receberam a aplicação do herbicida (D1), em relação à testemunha, sendo que o maior acúmulo de aminobutírico ocorreu para o híbrido H5, seguido pelo H1 com valores de 0,031648 e 0,024627 mg g ms⁻¹ (Figura 21A) o que representa um incremento em relação à testemunha de 460,33 e 203,74%, respectivamente. Os demais híbridos comparados às suas testemunhas podem ser classificados quanto ao acúmulo de ácido aminobutírico da seguinte forma: H4>H2>H7>H8>H6>H3, sendo respectivamente 167,79; 153,59; 122,60; 107,18; 97,63 e 77,65%.

O acúmulo de ácido aminobutírico em plantas de *Lemma minor* L aplicadas com chlorsulfuron foi relatado por Rhodes et al. (1987), esses autores propuseram que a inibição da acetolactato sintase por esse herbicida gera o acúmulo de 2-

oxobutirato na rota de síntese de isoleucina, desencadeando a sua transaminação para α -aminobutirato.

Figura 21 - Teores do ácido aminobutírico (A), valina (B), leucina+isoleucina (C) e ácido quínico (D) com e sem aplicação do nicosulfuron em híbridos de milho no estágio fenológico V2





- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas iguais não diferem entre os híbridos dentro de cada dose e letras minúsculas iguais não diferem entre as doses dentro de cada híbrido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). D0 = tratamento testemunha; D1 = tratamento aplicado com a dose de 120 g i.a. ha⁻¹.

O híbrido H5 quando comparado com os demais híbridos estudados, mostrou-se o mais sensível à ação do herbicida quando os parâmetros altura e fitointoxicação foram analisados. No híbrido H1, aos 7 DAA do herbicida, pode-se observar a redução de 12% na altura das plantas aplicadas em relação a testemunha, esse híbrido também apresentou, juntamente com o H7, as maiores reduções de massa seca. Indicando assim, que esses dois híbridos que se mostraram mais sensíveis à ação do herbicida dependendo do parâmetro de crescimento analisado, apresentaram maior acúmulo nos teores de aminobutírico. No entanto, híbridos

como H3 e H7 que também apresentaram reduções significativas de massa seca, mas não mostraram sensibilidade nas demais variáveis estudadas, exibiram baixos teores de aminobutírico.

Shaner e Singh (1993) também relataram acúmulo de 2-cetobutirato (2-KB) e 2-aminobutirato (2-AB) em plantas de milho aplicadas com o herbicida imazaquin. Tal como o experimento realizado, esses autores não encontraram resultados que demonstrassem que o acúmulo de aminobutírico inibiu o crescimento das plantas.

No entanto, Loper, Cobb e Anderson (2002) comprovaram que a determinação do ácido aminobutírico, utilizado como indicador químico, é uma técnica excelente e seletiva para herbicidas inibidores da ALS podendo ser utilizada em ensaios de campo. Essa técnica também pode ser aplicada para estudos de resistência de plantas daninhas a herbicidas inibidores da ALS e seletividade desses herbicidas a culturas.

Em relação aos teores de valina, ocorreram reduções significativas desse aminoácido após a aplicação de nicosulfuron para os híbridos H1, H6, H7 e H8 (Figura 21B), com reduções em relação às suas testemunhas de 11,38; 16,34; 17,72 e 19,08%, respectivamente. Para os híbridos H2, H3, H4 e H5 não foram observadas diferenças nos teores de valina após a aplicação do herbicida, em relação aos teores das testemunhas.

Os teores de leucina+isoleucina apresentaram reduções significativas após aplicação do herbicida apenas nos híbridos H6, H7 e H8 (Figura 21C), com decréscimos de 6,95; 9,90 e 15,07% em relação às suas testemunhas, respectivamente.

Os maiores teores naturais de valina e leucina+isoleucina, ou seja, aqueles presentes nas plantas que não receberam a aplicação do herbicida, foram encontrados no H1 (0,1256 mg g ms⁻¹), embora esse híbrido tenha mostrado certo nível de sensibilidade ao nicosulfuron quando as variáveis altura e massa seca foram analisadas. Já os menores teores desses aminoácidos nas plantas não aplicadas foram encontrados no H4 (0,1007 mg g ms⁻¹) e H5 (0,1118 mg g ms⁻¹), enquanto o primeiro híbrido apresentou um comportamento intermediário, o segundo se destacou como mais sensível à ação do herbicida quando as variáveis altura e fitointoxicação foram analisadas. De maneira geral, quando todos os híbridos são analisados em conjunto, não há uma relação entre a maior ou menor atividade da

rota dos aminoácidos nos diferentes híbridos de milho e a sensibilidade dessas plantas ao nicosulfuron.

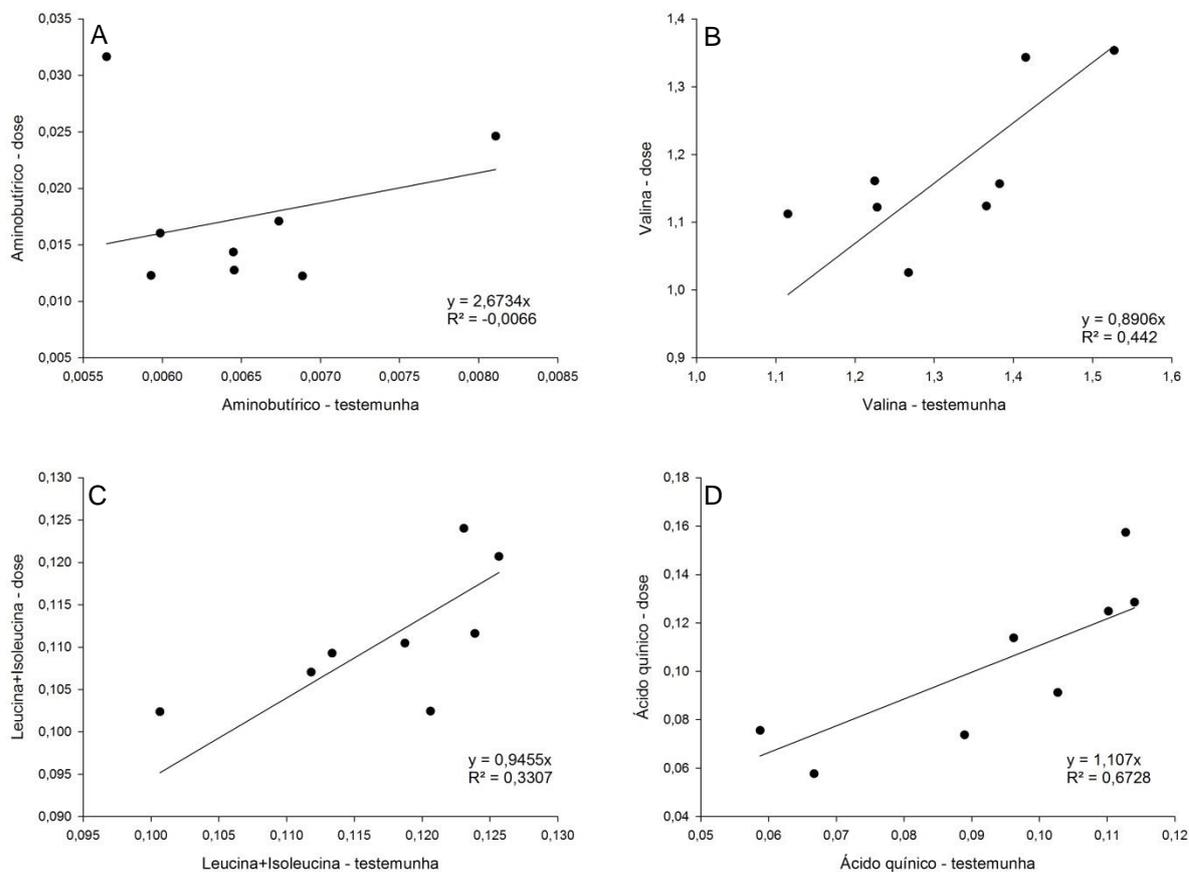
Em relação ao ácido quínico (Figura 21D), para o H7 o teor nas plantas após a aplicação do herbicida foi significativamente maior daquele encontrado na testemunha, representando um incremento de 39,62%. Apesar de não haver diferença estatística em relação às testemunhas, aumentos nos teores desse ácido também foram observados para os híbridos H1, H4, H5 e H6, com incrementos de 28,67; 18,34; 12,74 e 13,30%, respectivamente.

Orcaray et al. (2010) também observaram o acúmulo de quinato em folhas de *Pisum sativum* L. logo após a aplicação de herbicidas inibidores da ALS. Com a aplicação de imazethapyr e chlorsulfuron as plantas apresentaram teores de quinato 2,4 e 1,4 vezes maiores que os teores encontrados na testemunha. Os autores afirmam que esse acúmulo parece ser um efeito fisiológico comum aos herbicidas inibidores da biossíntese de aminoácidos, tendo um importante papel na fitointoxicação causada por eles.

O híbrido H2 que apresentou as menores porcentagens de fitointoxicação, H3 onde foram observados os maiores valores de altura acumulada e H8 que não apresentou redução de massa seca quando comparado à testemunha, apresentaram menores teores de ácido quínico após a aplicação do herbicida. Embora não tenham sido significativas, as reduções foram de 13,52; 17,08 e 11,19%, respectivamente.

Na Figura 22 pode-se observar que os teores dos aminoácidos valina, leucina+isoleucina e do ácido quínico quantificados após aplicação do nicosulfuron não puderam ser correlacionados com a atividade do herbicida nas plantas. Ao comparar os teores presentes nas plantas não aplicadas com as tratadas, não foi possível observar alterações significativas nas concentrações desses compostos, sendo que os teores nessas duas situações foram similares em todos os híbridos estudados.

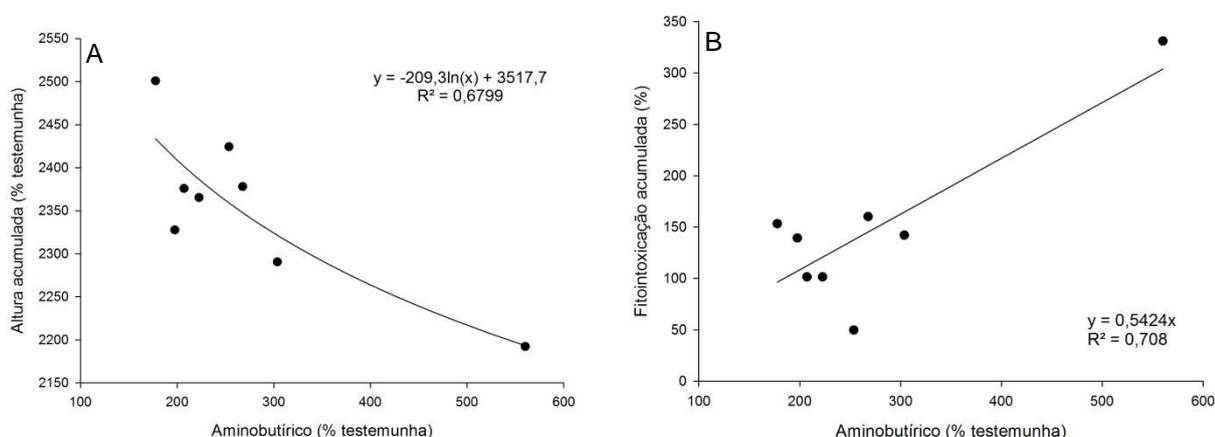
Figura 22 - Correlação dos teores de aminobutírico (A), valina (B), leucina+isoleucina (C) e ácido quínico (D) em híbridos de milho com e sem aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V2



- Testemunha: sem aplicação, dose: aplicação de 120 g i.a. ha⁻¹.

Para alguns híbridos foi possível estabelecer uma correlação entre os teores de aminobutírico em relação à testemunha e os valores de altura e fitointoxicação acumulada (Figura 23), sendo que os maiores acúmulos de aminobutírico ocorreram para os híbridos que apresentaram maior sensibilidade à ação do herbicida quando esses parâmetros foram analisados. O parâmetro massa seca, determinado com a coleta das plantas aos 28 DAA, não pode ser correlacionado com os teores de aminobutírico nos híbridos de milho. Tais resultados podem ser atribuídos ao período tardio de coleta, uma vez que ao longo do desenvolvimento da cultura verificou-se redução nos níveis de fitointoxicação das plantas.

Figura 23 – Correlação dos teores de aminobutírico com valores de altura (A) e fitointoxicação (B) acumulada, em oito híbridos de milho após aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V2



Ao analisar os teores do ácido aminobutírico, valina, leucina+isoleucina e ácido quínico após a aplicação do herbicida nicosulfuron em diferentes híbridos de milho, no estágio fenológico V6, foi possível verificar interação significativa entre os híbridos e as doses aplicadas para todos os compostos analisados, conforme verificado na análise de variância (Tabela 8).

Tabela 8 – Análise de variância dos teores de ácido aminobutírico, valina, leucina+isoleucina e ácido quínico em híbridos de milho após aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V6

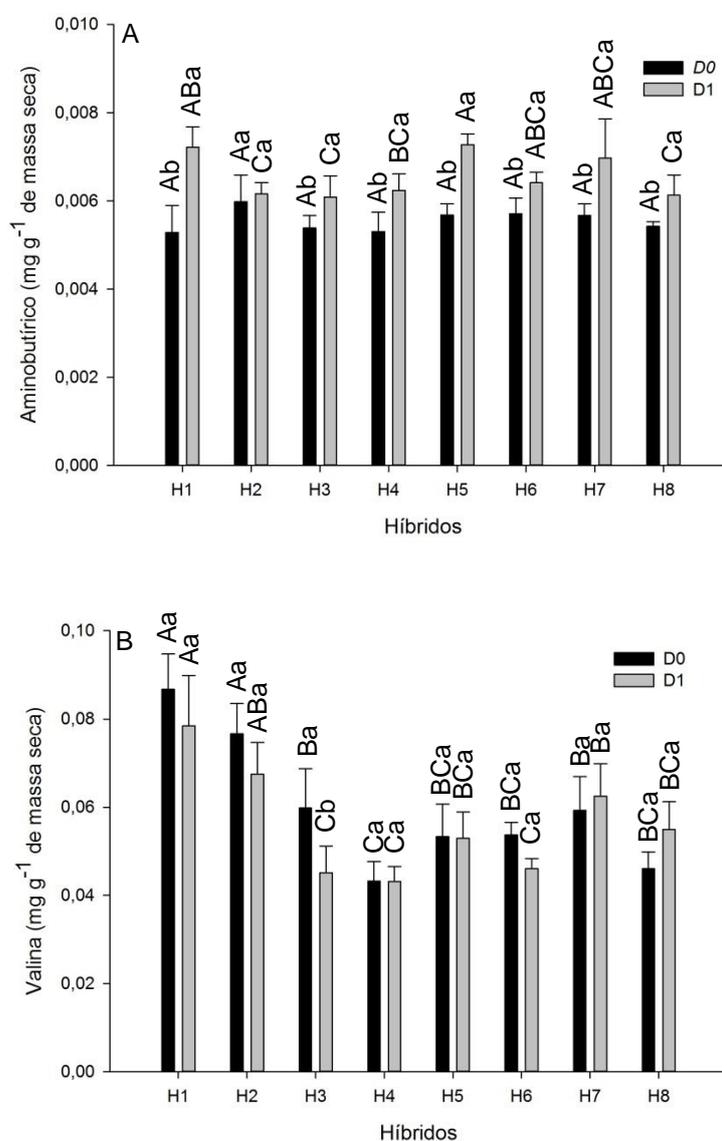
| FV | GL | Quadrado Médio | | | |
|-------------|----|----------------|----------|--------------------|---------------|
| | | Aminobutírico | Valina | Leucina+Isoleucina | Ácido quínico |
| Híbrido (H) | 7 | 0,0000** | 0,0017** | 0,0019** | 0,0467** |
| Dose (D) | 1 | 0,0000** | 0,0024** | 0,0002* | 0,0103* |
| H x D | 7 | 0,0000** | 0,0015** | 0,0001** | 0,0036* |
| Resíduo | 64 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0001 | 0,0040 |
| CV (%) | | 8,20 | 13,09 | 12,76 | 16,80 |

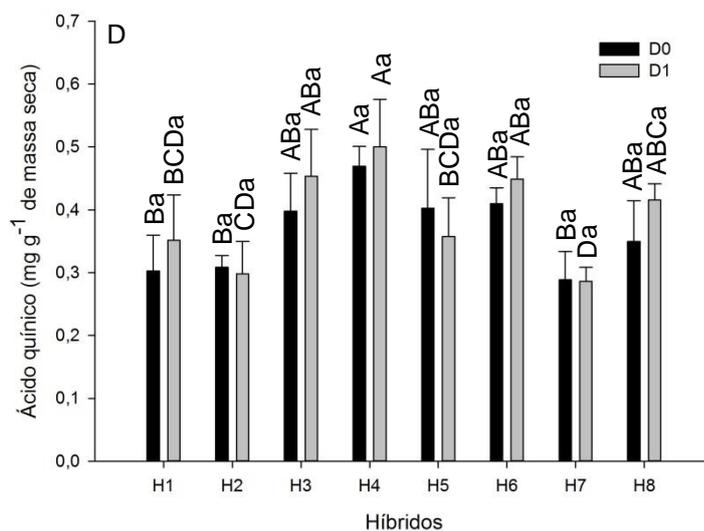
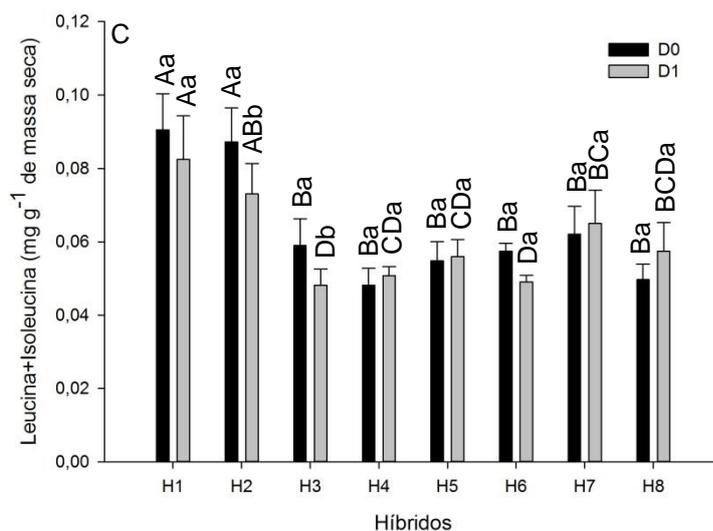
*significativo a $p \leq 0,05$ e a ** $p < 0,01$

Para todos os híbridos, com exceção do H2, a aplicação do nicosulfuron no estágio fenológico V6 resultou no aumento do teor de ácido aminobutírico (Figura 24A), entretanto, o acúmulo foi menor do que o observado após a aplicação do herbicida no estágio V2. Tais resultados estão de acordo com os relatados por Li e Wang (2005), após a aplicação de bensulfuron em plantas de *Brassica rapa*, os teores de aminobutírico foram consideravelmente menores nas plantas aplicadas no estágio V8, quando comparado aos teores acumulados nas plantas aplicadas no estágio V3.

Os maiores acúmulos ocorreram nos híbridos H5 e H1 que apresentaram teores de 0,007276 e 0,007219 mg g ms⁻¹ (Figura 24A), representando um incremento em relação às suas testemunhas de 28,11 e 36,50%, respectivamente. Os demais híbridos comparados às suas testemunhas podem ser classificados quanto ao acúmulo de aminobutírico da seguinte forma: H7>H4>H8>H3>H6>H2, sendo respectivamente 22,89; 17,62; 13,08; 12,96; 12,26 e 2,94%.

Figura 24 - Teores do ácido aminobutírico (A), valina (B), leucina+isoleucina (C) e ácido quínico (D) com e sem aplicação do nicosulfuron em híbridos de milho no estágio fenológico V6





- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas iguais não diferem entre os híbridos dentro de cada dose e letras minúsculas iguais não diferem entre as doses dentro de cada híbrido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). D0 = tratamento testemunha; D1 = tratamento aplicado com a dose de 120 g i.a. ha⁻¹.

Os híbridos H1 e H3, que foram considerados os mais tolerantes quando as variáveis massa seca, fitointoxicação e altura foram analisadas, apresentaram maiores acúmulos de aminobutírico em relação às suas testemunhas do que o híbrido H6 que, assim como o H5, mostrou maior sensibilidade ao nicosulfuron. Dessa forma, sugere-se que para o estágio fenológico V6 a tolerância dos híbridos de milho não pode ser analisada pelo acúmulo do ácido aminobutírico.

Os teores do ácido aminobutírico podem ser influenciados por diversos fatores, dentre eles a espécie da planta, a dose do herbicida inibidor da ALS, bem

como pelas condições ambientais. Nesse sentido, para que o aminobutírico possa ser utilizado como marcador para detectar a atividade dos herbicidas pertencentes a esse mecanismo de ação, dois pré-requisitos são necessários: a suscetibilidade das plantas a esses herbicidas e o acúmulo desse composto antes que os sintomas de intoxicação sejam visíveis (LI; WANG, 2005).

Em relação aos teores de valina, não houve diferença estatística entre os teores nas plantas testemunhas e aqueles acumulados nas plantas tratadas, com exceção do H3 que apresentou redução significativa de 24,56% no nível de valina em relação à testemunha. Os demais híbridos apresentaram leves reduções após a aplicação do herbicida, com exceção do H7 e H8 com incremento em relação às suas testemunhas de 5,43 e 19,38%, respectivamente (Figura 24B).

Os teores de leucina+isoleucina antes e após a aplicação do herbicida podem ser observados na Figura 24C. Reduções significativas nos níveis desses aminoácidos após a aplicação do herbicida foram observadas para os híbridos H2 e H3 com decréscimos em relação às testemunhas de 16,27 e 18,32%, respectivamente. Embora não tenham sido significativas, reduções também foram observadas para os híbridos H1 e H6. Os demais híbridos apresentaram aumento desses aminoácidos nas plantas tratadas.

Diversos autores observaram reduções drásticas nos teores de valina, leucina e isoleucina em plantas aplicadas com herbicidas inibidores da ALS, causando depleção seletiva dos aminoácidos de cadeia ramificada nas porcentagens do total de aminoácidos livres, considerando a falta desses aminoácidos uma das principais causas da paralização do crescimento e morte das plantas (ANDERSON; HIBBERD, 1985; RHODES et al., 1987; SHANER; REIDER, 1986; SHANER; SINGH, 1993; ZHOU et al., 2007).

O aumento do teor de aminoácidos livres em células de milho tratadas com herbicidas inibidores da ALS foi observado em experimentos realizados por Anderson e Hibberd (1985), no entanto os níveis de leucina e valina mostraram reduções significativas e após 48 horas da aplicação do herbicida representavam respectivamente 52 e 27% dos níveis observados nas células não tratadas. Resultados similares foram relatados por Shaner e Reider (1986), que observaram aumento de 32% no nível de aminoácidos livres em plantas de milho aplicadas com herbicidas inibidores da ALS. Nesses estudos evidenciou-se que o fornecimento

exógeno de valina, leucina e isoleucina pode reverter os efeitos inibitórios do crescimento causado por esses herbicidas.

Orcaray et al. (2010) observaram que a aplicação dos herbicidas imazethapyr e chlorsulfuron em *Pisum sativum* L. resultou na diminuição da proporção dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina em relação ao total de aminoácidos livres. A redução ocorreu nos três primeiros dias, sendo observado após esse período o aumento da concentração desses aminoácidos em relação à testemunha, apesar dos herbicidas inibirem a síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhao et al. (2016) que relataram o aumento dos aminoácidos valina e isoleucina em plantas de milho aplicadas com chlorsulfuron.

O aumento na concentração dos aminoácidos livres tem sido atribuído ao turnover proteico devido à maior degradação e menor taxa de síntese de proteínas (RHODES et al., 1987). Em estudo realizado por Nemat Alla et al. (2008) a aplicação de chlorimuron-ethyl em plantas de milho e trigo resultou no aumento de N-solúvel concomitante com a diminuição de N-total, dos teores de proteínas e com o aumento dos aminoácidos, sugerindo assim que um aumento na proteólise pode ter ocorrido. A aplicação de herbicidas inibidores da ALS praticamente elimina a síntese de proteínas, embora a síntese proteica ocorra após o tratamento com esses herbicidas, os componentes de aminoácidos dessas proteínas geralmente não são gerados a partir do nitrogênio recém-incorporado, mas são obtidos principalmente através da degradação da proteína. Sendo assim, o aumento na concentração dos aminoácidos não ocorre devido a uma maior taxa de síntese e sim a um aumento na quebra das proteínas existentes (NEMAT ALLA et al., 2008; ORCARAY et al., 2010; ZABALZA et al., 2006; ZABALZA et al., 2013).

As menores concentrações de valina nas plantas que não receberam a aplicação do herbicida foram observadas para os híbridos H4, H8, H5 e H6 com teores de 0,0433; 0,0460; 0,0533 e 0,0537 mg g ms⁻¹, respectivamente. Já os híbridos H1 e H2 apresentaram os maiores teores naturais de valina, 0,0867 e 0,0766 mg g ms⁻¹, respectivamente (Figura 24B). Na figura 24C pode-se observar as concentrações de leucina+isoleucina nas plantas sem aplicação, os maiores teores naturais desses aminoácidos foram encontrados nos híbridos H1 e H2 com valores de 0,0905 e 0,0872 mg g ms⁻¹. Os demais híbridos não diferiram estatisticamente

entre si apresentando valores abaixo de $0,065 \text{ mg g ms}^{-1}$, sendo o menor teor observado no H4 ($0,0481 \text{ mg g ms}^{-1}$).

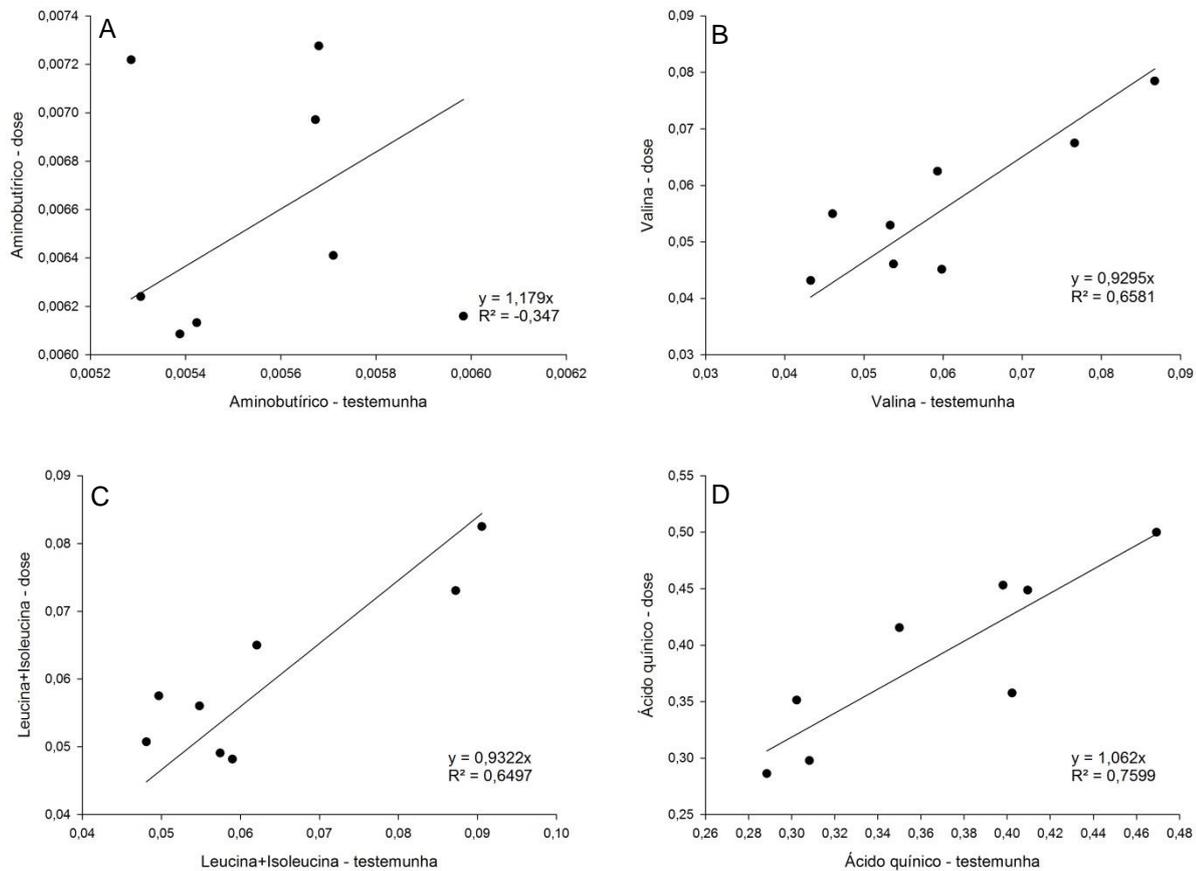
Os menores teores naturais de aminoácidos poderiam estar correlacionados com a maior sensibilidade dos híbridos de milho ao nicosulfuron, pois uma vez que a rota de síntese dos aminoácidos é menos ativa, sugere-se que mesmo em doses mais baixas o herbicida seria capaz de inibir a produção desses aminoácidos.

Os híbridos H5 e H6 apresentaram baixos teores de valina e leucina+isoleucina e avaliando os parâmetros fitointoxicação, massa seca e altura se mostraram os híbridos mais sensíveis à aplicação de nicosulfuron. No entanto, os híbridos H4 e H8 que não se destacaram como os mais sensíveis para nenhuma variável analisada, também apresentaram baixos teores de valina e leucina+isoleucina nas plantas não aplicadas.

Em relação ao ácido quínico (Figura 24D), para todos os híbridos não houve diferença significativa entre as concentrações na planta com e sem aplicação do herbicida, no entanto, os híbridos H2, H5 e H7 reduziram o teor desse ácido com a aplicação de nicosulfuron. Para os demais híbridos essa concentração aumentou com a aplicação do herbicida, sendo o maior incremento em relação à testemunha observado para o H8 (18,71%).

Para os aminoácidos valina, leucina+isoleucina e para o ácido quínico, não foram observadas alterações nos teores desses compostos em todos os híbridos, ao comparar os teores presentes nas testemunhas com as plantas tratadas (Figura 25). Em situações em que ocorreram o aumento ou redução desses compostos, os valores não foram muito expressivos, não permitindo correlacionar tal comportamento à sensibilidade das plantas ao herbicida.

Figura 25 - Correlação dos teores de aminobutírico (A), valina (B), leucina+isoleucina (C) e ácido quínico (D) em híbridos de milho com e sem aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V6



- Testemunha: sem aplicação, dose: aplicação de 120 g i.a. ha⁻¹.

5 CONCLUSÕES

A maior concentração do ácido aminobutírico ocorre um dia após a aplicação de nicosulfuron.

O aumento nos teores do ácido aminobutírico após a aplicação de nicosulfuron foi observado para os oito híbridos estudados tanto no estágio fenológico V2 quanto no V6.

Apenas para os híbridos no estágio fenológico V2 foi possível estabelecer uma correlação entre o acúmulo de aminobutírico e as variáveis altura e fitointoxicação acumuladas.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, P. C.; HIBBERD, K. A. Evidence for the interaction of an imidazolinone herbicide with leucine, valine, and isoleucine metabolism. **Weed Science**, v. 33, n. 4, p. 479–483, 1985.
- ANÉSIO, A. H. C. et al. Herbicide selectivity to signal grass and congo Grass. **Planta Daninha**, v. 35, p. 1–12, 2017.
- ARALDI, R. et al. Efeitos na taxa de transporte de elétrons de plantas daninhas após aplicação de amicarbazone. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 647–653, 2011.
- 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.
- BALBINOT JUNIOR, A. A.; FLECK, N. G. Manejo de plantas daninhas na cultura de milho em função do arranjo espacial de plantas e características dos genótipos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 245–252, 2004.
- BALBINOT JUNIOR, A. A.; TREZZI, M. M. Manejo químico de plantas daninhas na cultura do milho. In: WORDELL FILHO, J. A.; ELIAS, H. T. (Eds.). **A cultura do milho em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2012. p. 375–412.
- BARBAGALLO, R. P. et al. Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology**, v. 132, n. 2, p. 485–493, 2003.
- BARRETT, M. Metabolism of herbicides by cytochrome P450 in corn. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 12, n. 3–4, p. 299–316, 1995.
- CAREY, J. B.; PENNER, D.; KELLS, J. J. Physiological basis for nicosulfuron and primisulfuron selectivity in five plant species. **Weed Science**, v. 45, n. 1, p. 22–30, 1997.
- CATUNDA, M. G. et al. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 115–121, 2005.
- CAVALIERI, S. D. et al. Tolerância de híbridos de milho ao herbicida nicosulfuron. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 203–214, 2008.
- CAVALIERI, S. D. et al. Seletividade do nicosulfuron em três estádios fenológicos de milho-pipoca. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 377–386, 2012.
- CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpetcreeper with glyphosate. **Weed Science**, v. 49, n. 2, p. 156–163, 2001.

COLE, D. J. Detoxification and Activation of Agrochemicals in Plants. **Pesticide Science**, v. 42, p. 209–222, 1994.

COLEMAN, J. O. D.; BLAKE-KALFF, M. M. A.; DAVIES, T. G. E. Detoxification of xenobiotics by plants : chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 144–151, 1997.

CONAB. Análise das culturas. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: safra 2018/19: primeiro levantamento**, Brasília, DF, v. 6, n. 1, p. 74-79, out. 2018.

CONTIERO, R. L. Seletividade dos herbicidas nicosulfuron e foramsulfuron + iodossulfuron methyl sodium a diferentes cultivares de milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 1123–1134, 2009.

CRUZ, J. C. et al. **Produção de milho na agricultura familiar**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 42 p. (Circular Técnica, 159).

DAMIÃO FILHO, C. F.; MÔRO, F. V.; TAVEIRA, L. R. Respostas de híbridos de milho ao nicosulfuron. I - Aspectos biológicos de da produção. **Planta Daninha**, v. 14, n. 1, p. 3–13, 1996.

DAYAN, F. E. et al. Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. **Weed Science**, v. 63, n. sp1, p. 23–63, 2015.

DUARTE, J. DE O.; GARCIA, J. C.; MIRANDA, R. A. DE. Economia da produção. In: PEREIRA FILHO, I. A. (Ed.). **Cultivo do milho**. 9. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. p. 3–15.

DURNER, J.; GAILUS, V.; BOGER, P. New aspects on inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. **Plant physiology**, v. 95, p. 1144–1149, 1991.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Manejo de plantas daninhas. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Eds.). **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. p. 183–216.

FONNE-PFISTER, R. et al. Hydroxylation of primisulfuron by an inducible cytochrome P450-dependent monooxygenase system from maize. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 165–173, 1990.

FRANCISCO, E. A. B.; KAPPES, C. Intensificação ecológica em sistemas de produção de milho. In: PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; DUARTE, A. P.; TSUNECHIRO, A. (Eds.). **Diversidade e Inovações na Cadeia Produtiva de Milho e Sorgo na Era dos Transgênicos**. Campinas: Instituto Agrônômico / Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012. p. 721–732.

FREITAS, I. L. J. et al. Maximum quantum yield of photosystem II to assist in the measurement of herbicide selectivity in popcorn. **Plant Science Today**, v. 1, n. 2, p. 80–85, 2014.

GARCIA, J. C. et al. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. In: CRUZ, J. C. et al. (Eds.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. p. 21–46.

GARCIA, J. C.; DUARTE, J. DE O. Produção e consumo do milho. In: BORÉM, A.; RIOS, S. DE A. (Eds.). **Milho biofortificação**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. p. 23–44.

GUBBIGA, N. G. et al. Effect of nicosulfuron on Johnsongrass (*Sorghum halepense*) control and corn (*Zea mays*) performance. **Weed Technology**, v. 9, n. 3, p. 574–581, 1995.

GUERRA, N. et al. Seletividade de formulações de nicosulfuron para híbridos de milho em função da época da adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 9, n. 3, p. 89–99, 2010.

GUNSOLUS, J. L. Mechanical and cultural weed control in corn and soybeans. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 114–119, 1990.

GUTH, T. L. F. **Análise mensal**: milho, maio de 2018. Brasília, DF: Conab, 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-milho>>. Acesso em: 07 maio 2018.

HATZIOS, K. K. Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants: a brief overview and directions for future research. In: HATZIOS, K. K. (Ed.). **Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 1–5.

HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms: an overview. In: HALL, C.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M. (Eds.). **Pesticide biotransformation in plants and microorganisms**. Washington, DC: American Chemical Society, 2000. p. 2–27.

JAKELAITIS, A. et al. Controle de plantas daninhas na cultura do milho-pipoca com herbicidas aplicados em pós-emergência. **Planta Daninha**, v. 23, n. 3, p. 509–516, 2005.

KARAM, D.; MELHORANÇA, A. L.; OLIVEIRA, M. F. DE. Plantas daninhas na cultura do milho. In: CRUZ, J. C. et al. (Eds.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. p. 199–214.

KARAM, D.; RIZZARDI, M. A.; CRUZ, M. B. DA. Manejo e controle de plantas daninhas em milho e em sorgo. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. (Eds.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas2**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. p. 659–680.

KOZLOWSKI, L. A. Período crítico de interferência das plantas daninhas na cultura do milho baseado na fenologia da cultura. **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 365–372, 2002.

LAROSSA, R. A.; DYK, T. K. VAN; SMULSKI, D. R. Toxic accumulation of α -ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in salmonella typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 4, p. 1372–1378, 1987.

LI, Y.; WANG, C. 2-aminobutyric acid as a chemical marker for the detection of sulfonylurea herbicides. **Weed Technology**, v. 19, p. 176–182, 2005.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, v. 148, p. 350–382, 1987.

LOPER, B. R.; COBB, W. T.; ANDERSON, K. A. Chemical marker for ALS-inhibitor herbicides : 2-aminobutyric acid proportional in sub-lethal applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2601–2606, 2002.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F. et al. Seletividade de herbicidas para a cultura de milho (Zea mays) aplicados em diferentes estádios fenológicos da cultura. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 413–419, 2003.

MACIEL, C. D. DE G. Métodos de controle de plantas daninhas. In: MONQUERO, P. A. (Ed.). **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas2**. São Carlos: RiMa Editora, 2014. p. 129–144.

MCCOURT, J. A. et al. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. **PNAS**, v. 103, n. 3, p. 569–573, 2006.

MELHORANÇA, A. L. et al. Plantas daninhas. In: PEREIRA FILHO, I. A. (Ed.). **Cultivo do milho**. 9. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015.

MEROTTO JR., A. et al. Redução da interferência de Brachiaria plantaginea (Link) Hitch. em milho através de capinas e aplicação de herbicidas em diferentes épocas. **Planta Daninha**, v. 18, n. 3, p. 471–477, 2000.

MEROTTO JR., AL.; FISCHER, A. J. Absorção e translocação de herbicidas nas plantas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. (Eds.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas2**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. p. 89–106.

MEROTTO JUNIOR, A. et al. Aumento da população de plantas e uso de herbicidas no controle de plantas daninhas em milho. **Planta Daninha**, v. 15, n. 2, p. 141–151, 1997.

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.

MÔRO, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. Importância e usos do milho no Brasil. In: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. (Eds.). **Milho: do pantio a colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015. p. 9–25.

- MÔRO, F. V.; DAMIÃO FILHO, C. F. Alterações morfo-anatômicas das folhas de milho submetidas à aplicação de nicosulfuron. **Planta Daninha**, v. 17, n. 3, p. 331–337, 1999.
- MORTON, C. A.; HARVEY, R. G. Sweet corn (*Zea mays*) hybrid tolerance to nicosulfuron. **Weed Technology**, v. 6, n. 1, p. 91–96, 1992.
- 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.
- NEMAT ALLA, M. M. et al. Effect of metribuzin , butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 8–18, 2008.
- OBRIGAWITCH, T. T.; KENYON, W. H.; KURATLE, H. Effect of application timing on rhizome johnsongrass (*Sorghum halepense*) control with DPX-V9360. **Weed Science**, v. 38, n. 1, p. 45–49, 1990.
- OLIVEIRA JR., R. S. DE; 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: Omnipax, 2011. p. 243–262.
- ORCARAY, L. et al. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. **Pest Management Science**, v. 66, p. 262–269, 2010.
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoria de milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2005. p. 491–552.
- PITELLI, R. A. Competição e controle de plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série Técnica IPEF**, v. 4, n. 12, p. 1–24, 1987.
- 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.
- QUEIROGA, C. L. Analisadores de massa: QTRAP. In: **Espectrometria de massas: princípios e aplicações**. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/>>. Acesso em: 23 set. 2017.
- RHODES, D. et al. Amino Acid Metabolism of *Lemna minor* L. : II. Responses to Chlorsulfuron. **Plant physiology**, v. 84, p. 775–780, 1987.
- RIETHMULLER-HAAGE, I. et al. Can photosynthesis-related parameters be used to establish the activity of acetolactate synthase–inhibiting herbicides on weeds? **Weed Science**, v. 54, n. 6, p. 974–982, 2006.
- RIZZARDI, M. A. et al. Manejo de plantas daninhas na cultura do milho. In:

MONQUERO, P. A. (Ed.). **Manejo de plantas daninhas nas culturas agrícolas**. São Carlos: RiMa Editora, 2014. p. 41–52.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. DE. **Guia de herbicidas**. 6. ed. Londrina: GRAFMARKE, 2011.

ROSSI, I. H. et al. Interferência das plantas daninhas sobre algumas características agronômicas e a produtividade de sete cultivares de milho. **Planta Daninha**, v. 14, n. 2, p. 134–148, 1996.

SANGOI, L.; SILVA, P. R. F. DA. Ecofisiologia e estádios fenológicos. In: WORDELL FILHO, J. A.; ELIAS, H. T. (Eds.). **A cultura do milho em Santa Catarina**. 2. ed. Florianópolis: Epagri, 2012. p. 46–113.

SEVERINO, F. J.; CARVALHO, S. J. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Interferências mútuas entre a cultura do milho, espécies forrageiras e plantas daninhas em um sistema de consórcio. I - implicações sobre a cultura do milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 589–596, 2005.

SHANER, D. L. Physiological effects of the imidazolinone herbicides. In: SHANER, D. L.; O'CONNOR, S. L. (Eds.). **The imidazolinone herbicides**. Ann Arbor, MI: Lewis, 1991. p. 129–138.

SHANER, D. L. Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors in the United States: history, occurrence, detection, and management. **Journal of Weed Science Technology**, v. 44, n. 4, p. 405–411, 1999.

SHANER, D. L.; REIDER, M. L. Physiological responses of corn (*Zea mays*) to AC 243,997 in combination with valine, leucine, and isoleucine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 25, n. 2, p. 248–257, 1986.

SHANER, D. L.; SINGH, B. K. How does inhibition of acid biosynthesis kill plants? In: FLORES, H. E.; SHANNON, J. C. (Eds.). **Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants**. Rockville, MD: American Society Of Plant Physiologists, 1992.

SHANER, D. L.; SINGH, B. K. Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to accumulation of 2-ketobutyrate and/or 2-aminobutyrate. **Plant physiology**, v. 103, p. 1221–1226, 1993.

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. p. 21–66.

SILVA, A. A. DA et al. Biologia de plantas daninhas. In: SILVA, A. A. DA; SILVA, J. F. DA (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2009. p. 17–62.

SILVA, A. A. DA et al. Manejo de plantas daninhas. In: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. (Eds.). **Milho: do plantio a colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV,

2015. p. 242–272.

SILVA, J. F. DA et al. Herbicidas: absorção, translocação, metabolismo, formulação e misturas. In: SILVA, A. A. DA; SILVA, J. F. DA (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas2**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007. p. 149–188.

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

SPADER, V.; VIDAL, R. A. Seletividade e dose de injúria econômica de nicosulfuron aplicado em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura do milho. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 929–934, 2001.

TAPIA, L. S. et al. Postemergence herbicide application timing effects on annual grass control and corn (*Zea mays*) grain yield. **Weed Science**, v. 45, n. 1, p. 138–143, 1997.

TESTA, V. M.; SILVESTRO, M. L. Situação e perspectivas socioeconômicas para o milho. In: WORDELL FILHO, J. A.; ELIAS, A. T. (Eds.). **A cultura do milho em Santa Catarina**. 2. ed. Florianópolis: Epagri, 2012. p. 7–45.

USDA. **Agricultural Statistics 2017**. Washington, DC: Government Printing Office, 2017. Disponível em: <https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2017/index.php>. Acesso em 02 out. 2018.

VARGAS, L.; PEIXOTO, C. M.; ROMAN, E. S. **Manejo de plantas daninhas na cultura do milho**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 20 p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 61). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do61.pdf>. Acesso em: 20 agosto 2017.

VIDAL, R. A. et al. Mecanismo de ação dos herbicidas. In: MONQUERO, P. A. (Ed.). **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. São Carlos: RiMa Editora, 2014. p. 235–256.

WHALEY, C. M. et al. Comparison of mesotrione combinations with standard weed control programs in corn. **Weed Technology**, v. 20, n. 3, p. 605–611, 2006.

WHITCOMB, C. E. An introduction to ALS-inhibiting herbicides. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, n. 1, p. 232–240, 1999.

ZABALZA, A. et al. Nitrogen assimilation studies using ¹⁵N in soybean plants treated with imazethapyr, an inhibitor of branched-chain amino acid biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8818–8823, 2006.

ZABALZA, A. et al. Branched-chain amino acid biosynthesis inhibitors: Herbicide efficacy is associated with an induced carbon-nitrogen imbalance. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 9, p. 814–821, 2013.

ZABLOTOWICZ, R. M.; HOAGLAND, R. E.; HALL, J. C. Metabolism of pesticides by

plants and prokaryotes. In: CLARK, J. M.; OHKAWA, H. (Eds.). **Environmental Fate and Safety Management of Agrochemical Herbicides**. Washington, DC: American Chemical Society Symposium Series, 2005. p. 168–184.

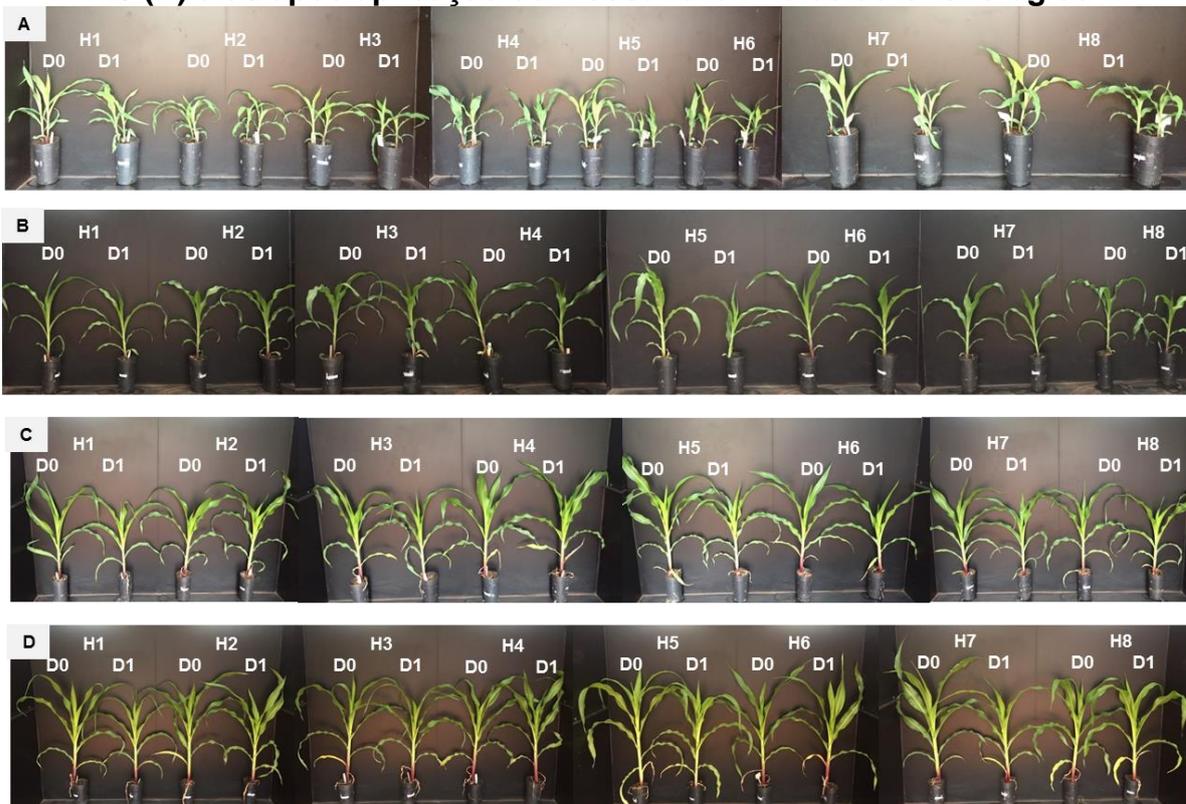
ZAGONEL, J.; VENÂNCIO, W. S.; KUNZ, R. P. Efeitos de métodos e épocas de controle das plantas daninhas na cultura do milho. **Planta Daninha**, v. 18, n. 1, p. 143–150, 2000.

ZHAO, L. et al. Enzymatic activity and chlorophyll fluorescence imaging of maize seedlings (*Zea mays* L.) after exposure to low doses of chlorsulfuron and cadmium. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 4, p. 826–836, 2018.

ZHAO, L. J. et al. Changes in metabolites in maize seedlings under chlorsulfuron and cadmium stress. **Journal of Agricultural Science**, v. 154, n. 5, p. 890–913, 2016.

ZHOU, Q. et al. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, p. 89–96, 2007.

APÊNDICE A – Fitointoxicação em híbridos de milho aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) dias após aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V2



APÊNDICE B – Fitointoxicação em híbridos de milho aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) dias após aplicação de nicosulfuron no estágio fenológico V6

