

**BRUNO FLAIBAM GIOVANELLI**

**SELETIVIDADE DE HERBICIDAS SOBRE MILHO ENLIST™**

**Botucatu**

**2019**



**BRUNO FLAIBAM GIOVANELLI**

**SELETIVIDADE DE HERBICIDAS SOBRE MILHO ENLIST™**

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

Orientador: Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari

**Botucatu**

**2019**

G512s	<p>Giovanelli, Bruno Flaibam  Seletividade de herbicidas sobre milho Enlist / Bruno Flaibam  Giovanelli. -- Botucatu, 2019  84 p. : tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu  Orientador: Caio Antonio Carbonari</p> <p>1. Pós-emergência. 2. Isolinha. 3. aad-1. 4. 2,4-D. 5.  haloxyfop-methyl. I. Título.</p>
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

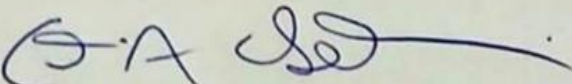
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

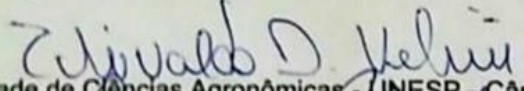
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SELETIVIDADE DE HERBICIDAS SOBRE MILHO ENLIST™

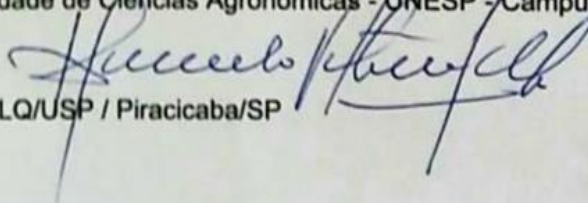
**AUTOR: BRUNO FLAIBAM GIOVANELLI**

**ORIENTADOR: CAIO ANTONIO CARBONARI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI   
Departamento de Produção Melhoramento Vegetal-FCA/UNESP / Botucatu/SP

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

Prof. Dr. RICARDO VICTÓRIA FILHO   
Departamento de Produção Vegetal / ESALQ/USP / Piracicaba/SP

Botucatu, 26 de agosto de 2019



*Às meus familiares e amigos,*

*dedico*



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me abençoar e iluminar durante esta caminhada.

Aos meus queridos pais, José Antonio Giovanelli e Luciana Flaibam Giovanelli, e irmã, Júlia Flaibam Giovanelli, pelo apoio incondicional e amor concedido. À minha avó, Maria de Lourdes, pela preocupação e apoio.

À minha namorada Alina Gava, por toda a paciência, amor e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari, pela orientação, ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, pela contribuição durante a pesquisa e demais ensinamentos durante esta jornada.

À empresa Corteva AgriScience e ao engenheiro agrônomo Felipe R. Lúcio, por proporcionarem a realização desta pesquisa, e pelo material cedido.

Ao professor Dr. Ricardo Victoria Filho, assim como demais membros do grupo PRO-HORT (ESALQ-USP), durante o período de graduação, por proporcionarem as primeiras experiências profissionais.

Ao Laboratório de Bromatologia, em especial ao Prof. Paulo Meirelles e a funcionária Gisele Setznagl, pelo auxílio prestado durante a pesquisa.

À toda equipe do laboratório NUPAM (Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia), em especial aos funcionários José Roberto Marques Silva, Luis Marcelo Siono, e José Guilherme Ferreira Cordeiro, pelo apoio prestado durante estes anos.

A todos os funcionários do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal e da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) por todo o apoio prestado às atividades de campo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

Aos amigos do NUPAM, em especial Renato Nunes Costa, Fábio Henrique Krenchinski, Natalia da Cunha Bevilaqua, e Vinícius Gabriel Caneppele Pereira, pelo auxílio incondicional na realização desta pesquisa, e por toda a amizade, assim como demais membros e estagiários.

Aos amigos da república Paraná, pela amizade e convivência, e a todos os membros da República 10 Alqueires (ESALQ), pelo aprendizado e incentivo para que pudesse chegar até aqui.

**A todos, agradeço!!**



*Na vida não importa o que você esteja fazendo, faça sempre o seu  
melhor.*

*Ayrton Senna*



## RESUMO

A tecnologia EnList™ foi desenvolvida pela empresa Corteva Agriscience, e permite a aplicação dos herbicidas 2,4-D e haloxyfop-methyl sobre o milho, devido à presença do gene *aad-1*, além da resistência ao glyphosate e amônio glufosinato. O objetivo deste trabalho foi avaliar a seletividade de diferentes herbicidas sobre a cultura do milho com a tecnologia EnList™. Os experimentos foram conduzidos em campo e casa de vegetação. Os herbicidas aplicados foram: haloxyfop-methyl, 2,4-D, e glyphosate. Os ensaios realizados em casa-de-vegetação foram organizados em delineamento inteiramente casualizado, constituídos por cinco repetições. Os herbicidas foram aplicados em pós-emergência (V4), e obteve-se as seguintes variáveis: taxa de transporte de elétrons do Fotossistema II (Electron Transport Rate - ETR), injúria visual, e altura aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA). Aos 28 DAA, foram coletadas as plantas para a obtenção da massa seca final. Os experimentos 1 e 2 corresponderam a aplicação de todos os herbicidas acima, tanto de forma isolada como em misturas. Neste mesmo estudo, foi instalado um ensaio adicional a campo para testar os parâmetros produtivos, porém com a adição de amônio-glufosinato. Os demais experimentos constituíram-se de ensaios de dose-resposta para cada um dos três herbicidas estudados, comparando-se um material com a tecnologia EnList™, e sua isolinha sem o gene *aad-1*. Portanto, os ensaios 3 e 4 se referiram a aplicação de doses crescentes de 2,4-D, que foram: 0; 456; 912; 1.824; 3.648 e 7.296 g e.a ha<sup>-1</sup>. Os experimentos 5 e 6 corresponderam às seguintes doses de haloxyfop-methyl: 0; 63; 126; 252; 504 e 1.008 g i.a ha<sup>-1</sup> e além das variáveis acima, analisou-se o teor total de lipídeos, através de análises de extrato etéreo. No experimento 7, foram testadas seis doses de glyphosate (0; 480; 960; 1.920; 3.840; 5.760 g e.a ha<sup>-1</sup>) sobre os materiais. No primeiro estudo, a aplicação dos tratamentos não resultou em injúrias visuais ou redução dos demais parâmetros, como a produtividade. Nos experimentos envolvendo 2,4-D, observou-se uma redução da ETR da isolinha, aos 21 e 28 DAA para as doses mais elevadas, com decréscimo de altura e massa seca. Com relação ao haloxyfop-methyl, não houve reduções em nenhuma das variáveis para as plantas resistentes. Porém, foram observadas reduções >50% da ETR para a isolinha, aos 3 DAA, assim como diminuição do teor de extrato etéreo para este material. No experimento envolvendo glyphosate, não

foram observadas diferenças significativas entre as variáveis. A tecnologia EnList™ é segura quanto aos herbicidas aplicados, nas doses de bula recomendadas.

**Palavras-chave:** Pós-emergência. Isolinha. *aad-1*. 2,4-D. haloxyfop-methyl. glyphosate.

## ABSTRACT

The EnList™ traits were developed by Corteva Agriscience, and provide both 2,4-D and haloxyfop-methyl resistance for maize due to the *aad-1* gene. In addition, it presents glyphosate and ammonium-glufosinate resistance. The objective of this research was to assess the selectivity of different herbicides for EnList™ maize. The experiments were conducted both in the field and in greenhouse. The herbicides applied were: haloxyfop-methyl, 2,4-D, and glyphosate. The greenhouse treatments were arranged in a completely randomized design and consisted of five replications. The herbicides were applied in post-emergence (V4), and the variables obtained were: Electron transport rate of photosystem II (Electron Transport Rate - ETR), visual injury, and plant height at 7, 14, 21 and 28 days after application (DAA). At 28 DAA, the plants were cut for obtaining the final dry mass. The experiments 1 and 2 corresponded to the application of all the herbicides cited above, both alone and in mixtures. In this same study, an additional field trial was conducted for testing the production parameters, adding ammonium-glufosinate to some treatments. The other experiments consisted of dose-response assays for each of the herbicides cited, comparing a material with the EnList™ technology, and its isoline (non *aad-1* material). The experiments 3 and 4 referred to increasing doses of 2,4-D application, which were: 0; 456; 912; 1.824; 3,648 and 7,296 g a.e ha<sup>-1</sup>. Experiments 5 and 6 corresponded to the following doses of haloxyfop-methyl: 0; 63; 126; 252; 504 and 1.008 g a.i ha<sup>-1</sup>, and in addition to the variables above, the total lipid content was analyzed by ethereal extract analysis. In experiment 7, six doses of glyphosate (0; 480; 960; 1,920; 3,840; 5,760 g a.a ha<sup>-1</sup>) were tested for each material. In the first study, the applications did not result on visual injuries or decrease of the other parameters, such as yield. In the experiments involving 2,4-D herbicide, there was a lower ETR at 21 and 28 DAA for the higher doses in the isoline, affecting plant height and dry mass. Haloxyfop-methyl applications did not reduce any of the variables for *aad-1* transformed plants. However, reductions >50% of the ETR were observed for the isoline at 3 DAA, and hence a decrease in the ethereal extract. For the glyphosate experiment, no significant differences were observed. The EnList™ trait is safe for these herbicides when used the recommended labeled rates.

**Keywords:** postemergence. isoline. *aad-1*. 2,4-D. haloxyfop-methyl. glyphosate



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aplicação dos Tratamentos.....	38
Figura 2 - Fluorômetro portátil (A) e avaliação de ETR (B) .....	38
Figura 3 - Representação da precipitação e temperaturas máximas, médias e mínimas durante o período de condução do experimento. Botucatu, SP .....	42
Figura 4 - Pesagem das amostras (A) e cartuchos para extração (B).....	45
Figura 5 - Extração das amostras (A) e gordura remanescente no tubo (B) .....	45
Figura 6 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) dos tratamentos, nos experimentos 1 (A) e 2 (B) .....	48
Figura 7 - Valores relativos (% em relação à testemunha) de altura aos 7, 14, 21 e 28 DAA dos tratamentos, para os experimentos 1 (A), e 2 (B).....	50
Figura 8 - Massa Seca (em gramas) dos tratamentos aos 28 dias após aplicação (DAA) nos experimentos 1 (A) e 2 (B).....	51
Figura 9 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 DAA de 2,4-D, nos experimentos 3 (A e B) e 4 (C e D), no material com gene aad-1 (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D) .....	55
Figura 10 - Valores relativos (% em relação à testemunha) de altura aos 7, 14, 21 e 28 DAA de 2,4-D, para os experimentos 3 (A e B) e 4 (C e D), no material com o gene aad-1 (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D) .....	57
Figura 11 - Porcentagem de injúria visual, aos 7, 14, 21 e 28 DAA de 2,4-D, para os experimentos 3 (A e B) e 4 (C e D), no material com o gene aad-1 (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D) .....	59
Figura 12 - Plantas de milho com o gene aad-1, submetidas a doses crescentes de 2,4-D (da esquerda para direita), aos 14 DAA .....	60
Figura 13 - Massa Seca (em gramas) das plantas de milho, aos 28 DAA de 2,4-D, para os experimentos 3 (A e B) e 4 (C e D), no material com o gene aad-1 (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D) .....	61
Figura 14 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 3, 7, 14, 21 e 28 DAA de haloxyfop-methyl, referente ao experimento 5, no material com o gene aad-1 (A) e sua isolinha sem o gene (B) .....	62
Figura 15 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 DAA de haloxyfop-methyl, referente ao experimento 6, no material com o gene aad-1 (A) e sua isolinha sem o gene (B) .....	63
Figura 16 - Valores absolutos de altura aos 7, 14, 21 e 28 DAA de haloxyfop-methyl, para os experimentos 5 (A e B) e 6 (C e D), no material com o gene aad-1 (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D) .....	65

Figura 17 - Porcentagem de injúria visual, aos 7, 14, 21 e 28 DAA de haloxyfop-methyl, para os experimentos 5 (A) e 6 (B), no material com o gene aad-1 (A) e sua isolinha sem o gene (B) .....	66
Figura 18 - Massa seca (em gramas) das plantas de milho, aos 28 DAA de haloxyfop-methyl, para os experimentos 5 (A e B) e 6 (C e D), no material com o gene aad-1 (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D) .....	67
Figura 19 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 DAA de glyphosate, referente ao experimento 7, no material com o gene aad-1 (A) e sua isolinha sem o gene (B).....	70
Figura 20 - Valores absolutos de altura aos 7, 14, 21 e 28 DAA de glyphosate, para o experimento 7, no material com o gene aad-1 (A) e sua isolinha sem o gene (B)....	71
Figura 21 - Massa Seca (em gramas) dos tratamentos aos 28 DAA de glyphosate, para o experimento 7, no material com o gene aad-1 (A) e sua isolinha sem o gene (B).....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos referentes aos experimentos realizados em casa de vegetação, sobre a seletividade de herbicidas em milho com o gene *aad-1*, 2019...39

Tabela 2 - Tratamentos referentes ao experimento realizado em campo, com milho apresentando o gene *aad-1*. Safra 2019.....41

Tabela 3 - Análise química e física do solo da área experimental, coletada na profundidade de 0-20 cm. Botucatu, SP.....41

Tabela 4 - Resultados inerentes ao experimento realizado em campo, sobre variáveis relacionadas ao desempenho agrônômico do milho com o gene *aad-1*. Botucatu, 2019 .....52

Tabela 5 - Teores de extrato etéreo (%) referentes ao experimento 5, em milho com o gene *aad-1* e sua isolinha sem o gene, aos 7, 14 e 28 DAA, submetidos às doses 0 e 126 g i.a.ha<sup>-1</sup> de haloxyfop-methyl .....68

Tabela 6 - Teores de extrato etéreo (%) referentes ao experimento 6, em milho com o gene *aad-1* e sua isolinha sem o gene, aos 7, 14 e 28 DAA, submetidos às doses 0 e 126 g i.a.ha de haloxyfop-methyl.....69



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AIE – Altura de Inserção da Espiga

AT – Altura Total

CE – Comprimento da Espiga

DAA – Dias Após Aplicação

DIM – Ciclohexanodionas

ETR – Electron Transport Rate

FOP – Ariloxypheoxypropionatos

GLU - Glufosinato de amônio

GLY - Glyphosate

HALO – Haloxyfop-methyl

M100 – Massa de Cem Grãos

NFG – Número de Fileiras de Grãos

NG/F – Número de Grãos por Fileira

NUPAM – Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia

PRO - Produtividade

TEST – Testemunha



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Importância econômica do milho .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2</b>	<b>Interferência de plantas daninhas na cultura do milho.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3</b>	<b>Controle de plantas daninhas na cultura do milho .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Controle químico de plantas daninhas.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Seletividade de herbicidas .....</b>	<b>31</b>
<b>2.4.1</b>	<b>A transgenia e a seletividade de herbicidas .....</b>	<b>32</b>
<b>2.5</b>	<b>Haloxifop-methyl e 2,4-D.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Local e informações gerais dos experimentos.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Experimentos 1 e 2 (casa de vegetação): seletividade de herbicidas, isolados e em mistura, sobre milho com o gene <i>aad-1</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Experimento em campo .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Experimentos 3 e 4: doses de 2,4-d aplicadas sobre milho com o gene <i>aad-1</i> e sua isolinha.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Experimentos 5 e 6: doses de haloxifop-methyl aplicadas sobre milho com o gene <i>aad-1</i> e sua isolinha.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Extrato etéreo .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Experimento 7: doses de glyphosate aplicadas sobre milho com o gene <i>aad-1</i> e sua isolinha.....</b>	<b>46</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Experimentos 1 e 2 (casa de vegetação): seletividade de herbicidas, isolados e em mistura, sobre milho com o gene <i>aad-1</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Experimento em campo .....</b>	<b>51</b>

4.2	Experimentos 3 e 4: diferentes doses de 2,4-d aplicadas sobre milho com o gene <i>aad-1</i> e sua isolinha .....	54
4.3	Experimentos 5 e 6: diferentes doses de haloxyfop-methyl aplicadas sobre milho com o gene <i>aad-1</i> e sua isolinha .....	62
4.3.1	Extrato etéreo.....	68
4.4	Experimento 7: doses de glyphosate aplicadas sobre milho com o gene <i>aad-1</i> e sua isolinha .....	69
5	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

O milho apresenta elevada importância econômica e social, e consiste em um dos principais cereais cultivados e consumidos no mundo todo, pois apresenta elevado valor energético, e é importante desde a produção de rações animais, assim como na alimentação humana e produção de etanol. O Brasil é o terceiro maior produtor, e segundo maior exportador deste grão. Com isso, seu cultivo é uma importante atividade em diversas regiões produtoras do país, principalmente a região Sul e Centro-Oeste, se estendendo às demais regiões do país.

As plantas daninhas exercem elevada influência na produtividade do milho, podendo causar danos diretos através de sua alta capacidade competitiva, assim como indiretos, podendo ser hospedeiras de pragas, doenças e nematoides, além de impactarem nas operações de colheita do cereal. Na cultura do milho, as perdas de produtividade devido à competição com plantas daninhas são variáveis, podendo chegar até 70%, dependendo das espécies infestantes e condições edafoclimáticas (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

Desta maneira, o controle de plantas daninhas é uma prática imprescindível para o sucesso de uma lavoura de milho, e para isso é necessária a combinação de diversas técnicas de controle, como: preventivo, cultural, físico, e químico, constituindo assim o manejo integrado de plantas daninhas.

O controle químico de plantas daninhas é o método mais utilizado pelos agricultores, principalmente em grandes áreas, devido ao maior rendimento operacional, não-revolvimento do solo, assim como elevada economia de mão-de-obra e eficiência dos herbicidas (VARGAS; PEIXOTO; ROMAN, 2006).

A aplicação de herbicidas em pós-emergência da cultura e das plantas daninhas é uma prática necessária para se evitar maiores competições e também que as espécies infestantes não completem o seu ciclo, evitando maiores produções de sementes. Dessa forma, os eventos transgênicos com resistência a herbicidas são aliados nesta modalidade de aplicação. Com o advento das culturas Roundup Ready® (RR), incluindo o milho, as quais são resistentes a aplicação de glyphosate, o número de casos de plantas daninhas resistentes a esta molécula aumentou de forma significativa, e as ferramentas de manejo vêm sendo mais escassas.

Devido a isso, outros eventos de transgenia vêm surgindo para auxiliar no manejo de plantas daninhas tolerantes e resistentes, e um dos exemplos é o milho EnList™, desenvolvido pela empresa Corteva Agriscience, e que deverá ser lançado comercialmente no Brasil. Esta tecnologia permite a aplicação de quatro diferentes moléculas de herbicidas em pós-emergência da cultura, que são: haloxyfop-methyl, 2,4-D, glyphosate, e glufosinato de amônio. Assim, o produtor terá à sua disposição mais possibilidades de manejo na pós-emergência do milho.

No entanto, é necessário se atentar quanto à seletividade destas moléculas à cultura, e para isso são importantes os estudos que provem a seletividade dos herbicidas que englobam o pacote tecnológico, verificando a possibilidade de injúrias e potencial de redução de produtividade do milho, garantindo assim uma maior segurança de aplicação ao produtor.

O objetivo do presente trabalho foi testar a seletividade de diferentes herbicidas que compõem o pacote tecnológico EnList™ na cultura do milho, tanto em misturas, nas doses recomendadas, como de maneira isolada e em diferentes doses.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância econômica do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie pertencente à família Gramineae/Poaceae, que cresce em geral de 1 a 4 metros de altura, constituindo uma espécie com excelente capacidade no armazenamento de energia (MAGALHÃES, 2002). Portanto, devido também ao seu elevado potencial produtivo, assim como seus componentes nutricionais, se constitui em um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000), podendo ser cultivado em diversas regiões, desde a latitude 58°N até 40°S, e do nível do mar, até 3.800 metros de altitude (PATERNIANI, 1995).

No Brasil, na safra 2018/2019, a produção total de milho está estimada em 95,2 milhões de toneladas, tendo as suas maiores produções nas regiões Sul e Centro-Oeste, especialmente nos estados do Paraná, com 15,9 milhões, e Mato Grosso correspondendo com 29,7 milhões (CONAB, 2019). A produção de milho cresceu 193,55% em 20 anos, com um acréscimo de 45,79% na área plantada durante o mesmo período (ARTUZO et al., 2019), constituindo-se em uma cultura que engloba os principais componentes durante a produção de rações nos mais diversos segmentos pecuários, como: bovinocultura, suinocultura e avicultura (ALVES; AMARAL, 2011).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, estando Estados Unidos e China como os dois primeiros, correspondendo com 366,3 e 215,9 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2018). No entanto, o Brasil ainda segue como segundo maior país exportador do grão (FIESP, 2019), e os principais responsáveis pelo abastecimento do mercado internacional de milho são: Estados Unidos, Brasil, Argentina, e Ucrânia (USDA, 2018).

Não apenas importante na produção de rações e demais alimentos, o milho se constitui em matéria-prima na produção de etanol. Os Estados Unidos geram mais de um terço de sua produção interna de etanol a partir do milho, tendo 99% de seus biocombustíveis gerados apenas a partir deste produto (LEITE; LEAL, 2007; PIMENTEL; PATZEK, 2005). No Brasil, a produção de etanol vem aumentando, e

saltou de 26.483 para 234.147 metros cúbicos ( $m^3$ ) entre as safras 2014/2015 e 2016/2017, respectivamente (NASTARI, 2019), e deve ultrapassar um bilhão de litros produzidos em 2019 (MARINHO, 2019).

Existem duas épocas principais de cultivo de milho no país: a primeira destas é denominada verão, ou “safra”, e a segunda é denominada “safrinha”, ou “segunda safra”. Na região Sul, a safra de verão é plantada entre os meses de agosto a setembro, e no Centro-Oeste, o plantio é realizado entre outubro e novembro (CRUZ et al, 2010). Já a “safrinha”, é plantada entre os meses de janeiro a março, dependendo da disponibilidade hídrica e do ciclo da cultura anterior, que em geral é a soja (FIORINI et al, 2018).

A área plantada durante a segunda safra, no período 2017/2018, foi em torno de 11,5 milhões, e na primeira safra foi de 5 milhões, no mesmo período, totalizando, portanto, 16,6 milhões de hectares de lavoura de milho no país (CONAB, 2019). Apesar do grande potencial produtivo que a cultura oferece, sua produtividade média nacional é relativamente baixa, em torno de  $5.524 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (CONAB, 2019). No entanto, este valor não reflete o real cenário de produção das principais regiões produtoras, as quais apresentam maior nível tecnológico, com produtividades acima da média nacional.

De acordo com Cruz et al. (2011), existe uma divergência entre as diferentes regiões produtoras, pois no Brasil existem muitas propriedades que apresentam menores áreas e baixo investimento tecnológico, sendo classificadas como de subsistência, apresentando, portanto, baixos rendimentos. Porém, principalmente na região Centro-Oeste, o cenário é diferente, com maior tecnologia e capital de investimento para se atingir elevadas produtividades. O custo de produção nesta região é em torno de 2.660,34 reais por hectare, em uma lavoura de alto investimento tecnológico (IMEA, 2018), e o preço da saca do grão (60 kg) segue em torno de R\$ 35,00 (CEPEA, 2019).

Devido aos custos de produção, é necessário que se tenha uma produtividade mínima para que os mesmos sejam pagos e se evitem prejuízos ao produtor. De acordo com Azevedo et al. (2018), durante a safra 2016/2017, foi necessário haver uma produtividade de pelo menos  $71 \text{ sacas ha}^{-1}$  para cobrir os custos necessários. Neste cenário, está incluso também o manejo de plantas daninhas, o qual deve ser realizado de forma a evitar possíveis prejuízos.

## 2.2 Interferência de plantas daninhas na cultura do milho

As plantas daninhas exercem elevada influência sobre a produtividade das culturas, e são responsáveis por perdas na produção agrícola. Estima-se que as perdas na produção de milho devido à competição por plantas daninhas são em torno de 13% ao ano (RIZZARDI et al, 2014). No entanto, o grau de interferência ocasionado pela presença de plantas daninhas nesta cultura pode variar de 10 a 80% (SILVA et al, 2015), ou mesmo de 50 a 90 % (CHIKOYE; UDENSI; LUM, 2005), dependendo de diversos fatores, como: espécies infestantes, grau de infestação, arranjo de plantas e condições edafoclimáticas (SILVA et al, 2015).

As plantas daninhas competem com a cultura por diversos recursos do meio que são essenciais ao desenvolvimento da cultura de interesse, tais como: água, luz, nutrientes, espaço, CO<sub>2</sub>, além de serem responsáveis pela liberação de compostos alelopáticos, os quais podem retardar ou inibir o crescimento da cultura. Além destes fatores, as mesmas são responsáveis por causar danos indiretos, hospedando pragas, doenças e nematoides (PITELLI, 1987), e por ocasionar também baixo rendimento operacional de máquinas no momento da colheita (VARGAS, PEIXOTO, ROMAN, 2006).

A interferência de plantas daninhas na cultura do milho, em geral, é mensurada através da produtividade (PITELLI, 2014). Segundo Fancelli e Dourado-Neto (1997), o número de grãos por área se constitui em um dos mais importantes componentes de rendimento. No entanto, é possível aferir outros parâmetros, como: massa de 100 grãos, altura de plantas, número de espigas por planta, e número de grãos por espiga. Balbinot Jr. e Fleck (2005) observaram diminuições destas variáveis para dois híbridos de milho, quando ambos foram submetidos à infestação de *Urochloa plantaginea* e *Euphorbia heterophylla*.

Devido a isso, é essencial que se conheça o período crítico de prevenção à interferência (PCPI) de cada cultura, que é considerado como o período em que a cultura deve permanecer livre de qualquer interferência de plantas daninhas, para que o seu rendimento não seja afetado (WEAVER; TAN, 1983; KNEZEVIC; EVANS; MAINZ, 2003). De um ponto de vista prático, perdas de produtividade ocorridas antes ou após este período não serão consideradas como significativas (KNEZEVIC; EVANS; MAINZ, 2003). Devido a isso, a época de início de controle das plantas daninhas é fundamental para o sucesso do manejo (MEROTTO JR. et al., 2000).

Estudos realizados com milho mostram que este período pode ser variável de acordo com diversos fatores, dentre estes: safra, localidade, espécies infestantes, e condições edafoclimáticas (KNEZEVIC et al., 2002). Tursun et al. (2016) demonstrou que o milho deve ser mantido livre da presença de plantas daninhas entre os estádios V1 a V12. No entanto, outros autores determinaram que este período deve ser entre V3 a V14 (HALL et al., 1992), ou mesmo V3 a V7-V10 (DOGAN et al., 2004). Dessa forma, Kozlowski (2002) destaca a importância do uso adequado de escalas fenológicas durante as práticas de manejo da cultura.

### **2.3 Controle de plantas daninhas na cultura do milho**

O controle de plantas daninhas em determinada cultura não deve ser visto como algo isolado, mas em conjunto, constituindo assim o manejo integrado de plantas daninhas. O mesmo é definido como um conjunto de métodos de controle, como: cultural, mecânico, genético, biológico, e químico, que visam avanços no controle de plantas daninhas, implementando diversas medidas de manejo, como: conhecimento dos principais períodos de interferência das plantas daninhas, rotação de culturas e aplicação de métodos conservacionistas (SWANTON; WEISE, 1991).

No entanto, antes de se abordar qualquer um dos métodos citados acima, convém ressaltar sobre a importância do método preventivo de controle de plantas daninhas, o qual é resultante de ações que visam evitar a emergência de plantas daninhas na cultura já estabelecida (MELANDER; RASMUSSEN; BÀRBERI, 2005). As principais técnicas de controle preventivo a serem citadas, são: limpeza de máquinas e implementos, assim como de carregadores e canais de irrigação, e o emprego de sementes certificadas (KARAM; RIZZARDI; CRUZ, 2008).

O controle cultural apresenta elevada relação com o controle preventivo, pois ambos visam diminuir o número de plantas daninhas emergidas, por aumentar o crescimento, a robustez e a competitividade da cultura em relação às infestantes (MELANDER; RASMUSSEN; BÀRBERI, 2005). Isso se dá através de práticas agrícolas que favoreçam um rápido estabelecimento da cultura, através de: adequado balanço nutricional, adoção de arranjo espacial de plantas recomendado ao híbrido e à região, assim como plantio em época ideal. Em complemento a isso, se faz

conveniente a escolha de híbridos que apresentem rápido crescimento inicial e elevado fechamento de entrelinhas (BALBINOT JUNIOR; FLECK, 2004).

O uso de coberturas vegetais se consiste em uma das estratégias de controle cultural empregada nas mais diversas regiões produtoras de grãos do país (ALTIERI et al, 2011), e promovem uma camada de cobertura vegetal sobre o solo, a qual irá proporcionar um impedimento físico à entrada de luz, além da possível liberação de compostos alelopáticos (TEASDALE; BESTE; POTTS, 1991). Em plantios de milho, a adoção de consórcios com forrageiras consiste em práticas de integração lavoura-pecuária, e que pode ser considerada como forma de controle cultural (PRINS; WIT, 2006), se constituindo também em uma das premissas do plantio direto, através do não revolvimento do solo e da rotação de culturas (ALVARENGA et al, 2001).

### **2.3.1 Controle químico de plantas daninhas**

O controle químico de plantas daninhas é uma ferramenta bastante adotada por produtores no mundo todo. A mesma consiste no emprego de substâncias químicas capazes de controlar as plantas daninhas. Suas principais vantagens, são: possibilidade em controlar espécies de difícil controle, assim como a eliminação de plantas daninhas na linha da cultura. Também, convém citar a importância do controle químico em épocas de maior precipitação, assim como o seu elevado rendimento operacional (OLIVEIRA JR; CONSTANTIN; INOUE, 2011). Com relação ao uso de mão-de-obra, Pleasant, Burt e Frisch (1994) ressaltam que o controle químico resulta em diminuição da mesma, assim como maior rapidez na operação.

Existem três épocas principais em que é possível se empregar o controle químico na cultura do milho: a primeira se trata da aplicação em pré-semeadura, que visa o controle das espécies infestantes antes da semeadura da cultura. Para isso, são empregados tanto produtos sistêmicos, como o glyphosate e 2,4-D, como de contato, como o paraquat (RIZZARDI et al, 2014).

Nesta época, é importante a dessecação tanto das plantas daninhas presentes, como de espécies de cobertura, e para isso, é necessário que haja um intervalo entre a aplicação do herbicida e a semeadura do milho, que irá depender dos herbicidas utilizados e suas respectivas doses, e da densidade e estágio de crescimento da espécie de cobertura (SILVA et al., 2015).

Tanto um intervalo de 1, como de 13 dias entre a dessecação de aveia-preta (*Avena strigosa* S.) e o plantio do milho, não afetaram o crescimento e rendimento da cultura (NEVES; FLECK; VIDAL, 1999). Porém, Corrêa et al. (2008) afirmam que deve ser respeitado um intervalo mínimo de 14 dias entre a dessecação das seguintes espécies: braquiária (*Urochloa brizantha* cv. Marandu), milheto (*Pennisetum americanum*), e crotalária (*Crotalaria juncea*), e a semeadura do milho.

A segunda época de aplicação ocorre na pré-emergência da cultura, e é realizada logo após a sua semeadura, através de herbicidas que apresentam maior poder residual no solo, como aqueles pertencentes aos grupos químicos das triazinas e das amidas (RIZZARDI et al, 2014). Neste caso, é necessário se conhecer os fatores que influenciam a estabilidade dos produtos, como: textura e umidade do solo, além das propriedades físico-químicas da molécula, determinando assim a sua segurança de aplicação, e sucesso no controle das plantas daninhas (ANDERSON, 1983).

Ao se empregar herbicidas de aplicação em pré-emergência, se faz necessário o conhecimento do seu potencial de “carryover”, fato que poderá implicar em reduções de crescimento e perdas de produtividade do milho (ARTUZI; CONTIEIRO, 2006; SOLTANI et al., 2011; DAN et al., 2012), ou mesmo em outras culturas subsequentes, como foi observado por Gonçalves et al. (2018), ao testar o “carryover” dos seguintes herbicidas: atrazine, flumioxazin, metribuzin, e a mistura pronta de (diuron + hexazinone + sulfometuron) sobre a cultura do milho, aplicados 120 dias antes da semeadura, gerando decréscimos no acúmulo de matéria seca da planta e produtividade, com exceção a atrazine, que se apresenta como altamente seletiva a esta cultura.

A terceira época de aplicação de herbicidas ocorre na pós-emergência do milho e das plantas daninhas. Com isso, é importante se avaliar alguns fatores externos, principalmente as condições ambientais (temperatura, umidade relativa do ar, e velocidade do vento), e o equipamento a ser utilizado (limpeza e regulagem), que irão interferir na eficácia da aplicação, principalmente pela possibilidade de deriva (FOLONI, 2000).

Um dos herbicidas registrados para aplicação em pós-emergência do milho é o nicosulfuron, pertencente ao grupo químico das sulfonilureias, e apresenta como mecanismo de ação a inibição da enzima ALS (KARAM; RIZZARDI; CRUZ, 2008). Convém citar também o registro do herbicida 2,4-D a esta cultura, no entanto, ambas

as moléculas citadas apresentam limitações quanto a sua seletividade, e portanto, devem ser estudadas para se posicionar o seu adequado uso.

## **2.4 Seletividade de herbicidas**

A seletividade de herbicidas é considerada um fator-chave no posicionamento de uso das moléculas à cultura. 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). De acordo com Hertwig (1977), é aquele que quando aplicado conforme instruções de uso, não causa danos às culturas em que é recomendado.

Os fatores que determinam a seletividade de um herbicida a cultura são diversos, tais como: dose, formulação, híbrido, estágio de aplicação, metabolismo diferencial, assim como o uso da transgenia para tornar algumas culturas resistentes a determinadas moléculas (OLIVEIRA JR.; INOUE, 2011).

O metabolismo diferencial é considerado o principal fator de seletividade dos herbicidas às culturas, devido à diferença na capacidade de metabolização entre a cultura e as plantas daninhas (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1992; COLE, 1994). Os principais complexos enzimáticos envolvidos neste processo são o citocromo P450 monooxygenase (VAN EERD et al., 2003; YUAN; TRANEL; STEWART JR, 2007), responsável, por exemplo, pela metabolização de alguns herbicidas do grupo das sulfoniluréias, como o nicosulfuron em milho (CAVALIERI et al. 2008).

As enzimas Glutathiona-S-transferases (GSTs) também exercem importante papel na metabolização de alguns grupos químicos de herbicidas, como as triazinas e as cloroacetamidas (CARVALHO et al., 2009), citando-se como exemplo a atrazine e s-metolachlor, respectivamente, os quais apresentam registro de uso à cultura do milho (AGROFIT, 2019).

### 2.4.1 A transgenia e a seletividade de herbicidas

A transgenia vem sendo cada vez mais empregada como um fator de seletividade de herbicidas às culturas. Esta técnica se dá através do isolamento de um gene de interesse a ser inserido em determinada cultura comercial. No Brasil, o milho é a cultura que mais engloba eventos transgênicos, com 59 aprovações pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) (CIB, 2018), e no mundo, também apresenta elevada aprovação de eventos, com 232 aprovações em 30 países, desde 1992 (ISAAA, 2019).

A inserção de genes que apresentam a característica de tornar plantas de milho resistentes a herbicidas é um avanço, devido a não descoberta recente de novas moléculas, e o crescente número de relatos de plantas daninhas resistentes aos produtos existentes. Portanto, com estas tecnologias, é possível o emprego de herbicidas já consolidados, e que antes não eram seletivos à cultura (WESTWOOD et al., 2018).

A liberação do primeiro evento transgênico com resistência a herbicidas para a cultura do milho no Brasil, ocorreu em 2007, e se trata do evento “T25”, que apresenta o gene *pat*, responsável pela degradação do herbicida glufosinato de amônio, através da enzima phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT), transformando o herbicida em N-acetyl glufosinato de amônio, por acetilação (ISAAA, 2019). Com isso, se tornou possível a aplicação desta molécula na pós-emergência de híbridos de milho com esta tecnologia, denominada Liberty Link®.

Alguns híbridos de milho com tecnologias “bt”, ou seja, com genes provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis*, e que promovem resistência contra insetos lepidópteros, utilizam o gene *pat* como marcador de seleção (OLIVEIRA JR., 2011). Portanto, alguns híbridos de milho com a tecnologia “bt” já apresentam resistência ao herbicida glufosinato de amônio.

O glufosinato de amônio é um herbicida de contato e não-seletivo, apresentando elevado espectro de controle para as mais diversas espécies de plantas daninhas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas, inibindo o metabolismo do nitrogênio na planta ao impedir a transformação de glutamato + amônia em glutamina (BERIAULT; HORSMAN; DEVINE, 1999), ocasionando assim um excessivo acúmulo

de amônia, e por consequência, inibição da fotossíntese, necrose de tecidos, e morte da planta (COETZER; AL-KHATIB, 2001; PLINE; WU; HATZIOS, 1999).

O segundo evento de transgenia com resistência a herbicidas em milho foi liberado no país no ano de 2008, denominado Roundup Ready® (RR), e se trata do evento “GA21”, que apresenta o gene *mepsps*, inserido através da técnica de bombardeamento de micropartículas (ISAAA, 2019). Dessa forma, é possível a aplicação do herbicida glyphosate em pós-emergência, devido à presença de uma enzima EPSPs insensível ao herbicida, advinda da mesma enzima endógena de milho (SIDHU et al., 2000). Esta EPSPs expressa semelhança de 99,3% com a enzima selvagem, (CAJACOB et al., 2007).

No entanto, a expressão da referida EPSPs era baixa, tendo ocasionado alguns problemas de fitointoxicação. Portanto, foi desenvolvida a segunda geração de milho RR, denominada assim Roundup Ready 2™ (RR2™), através do desenvolvimento do evento “NK603”, o qual apresenta maior expressão da enzima EPSPs (com similaridade de 99,7% com a espécie selvagem) (CAJACOB et al., 2007), devido à inserção do gene *cp4-epsps* (ISAAA, 2019). Convém ressaltar que no Brasil, os primeiros híbridos comerciais com resistência ao glyphosate já pertenciam à segunda geração RR (ALBRECHT et al., 2014).

O glyphosate é um herbicida de elevado espectro de controle sobre as espécies infestantes, considerado como não-seletivo. Atua inibindo a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), gerando um acúmulo de ácido chiquímico, com a posterior inibição da síntese dos seguintes aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina, e triptofano (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997; VELINI et al., 2009). Apresenta elevada mobilidade nos tecidos do floema, e quando aplicado sobre folhas maduras, o mesmo segue o sentido de tecidos mais jovens da planta, como folhas novas e raízes (DUKE; POWLES, 2008).

Em plantas de milho resistentes ao glyphosate, a CP4-EPSPs insensível ao mesmo e a GA21 promovem um “by-pass” na rota do shiquimato, fazendo com que a rota funcione normalmente, mesmo que a enzima nativa da planta seja inibida pelo glyphosate (DILL, 2005).

Devido ao fato de ser não-seletivo, o glyphosate é bastante empregado em operações de dessecação em pré-plantio, tanto de forma isolada como em mistura com outros ingredientes, como o 2,4-D e graminicidas em geral, como haloxyfop e

clethodim. Porém, com o seu uso inadequado após a introdução das culturas RR, inúmeros relatos de resistência a esta molécula passaram a ser registrados.

No mundo, existem 309 relatos de resistência ao glyphosate, envolvendo 43 espécies de plantas daninhas. No Brasil, são 15 relatos em 8 espécies, e como destaque é possível citar as seguintes: buva (*Conyza* sp.), capim-amargoso (*Digitaria insularis*), capim pé-de-galinha (*Eleusine indica*) (HEAP, 2019) e mais recentemente no Rio Grande do Sul, outra espécie de caruru (*Amaranthus hybridus*) (OLIVEIRA et al., 2019). Em alguns destes casos se trata de resistência múltipla, ou seja, a mais de um mecanismo de ação de herbicidas.

Dessa forma, é importante se realizar o manejo integrado destas espécies, através principalmente da rotação de mecanismos de ação de herbicidas (KARAM et al., 2018), e para isso, novas ferramentas de biotecnologia vem surgindo para auxiliar, como já foi aprovado pela CTNBio o evento “DAS40278”, que corresponde ao milho EnList™, desenvolvido pela empresa Corteva Agriscience, que irá englobar um único gene de resistência (*aad-1*), tanto para o herbicida 2,4-D, como para o graminicida haloxyfop, além da própria resistência ao glufosinato de amônio (gene *pat*), e glyphosate (*cp4 epsps*) (ISAAA, 2019).

O gene *aad-1* é responsável por expressar uma enzima, denominada: “aryloxyalkanoate dioxygenase-1” (AAD-1), que é capaz de degradar de forma seletiva os enantiômeros “R” (parte ativa) dos herbicidas pertencentes ao grupo dos aryloxyphenoxipropionato (FOPs), como o haloxyfop, e também a molécula de 2,4-D (ISAAA, 2019; WRIGHT et al., 2010). Este gene é derivado de uma bactéria de solo, denominada *Sphingobium herbicidovorans*, que emprega a enzima AAD-1 para transformar o 2,4-D em seu metabólito, correspondente ao “2,4-diclorofenol” (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2014). Vale ressaltar que a mesma tecnologia também estará disponível para a cultura da soja, porém com outro gene (*aad-12*), isolado da bactéria *Delftia acidovorans*, que expressa a enzima AAD-12, capaz de degradar não apenas o 2,4-D, mas também outras moléculas de mesmo mecanismo de ação, como triclopyr e fluroxypyr (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2014).

Dessa forma, o milho com esta tecnologia será resistente a aplicação de haloxyfop e 2,4-D em pós-emergência, com o intuito de controlar as espécies resistentes ao glyphosate que emergem após o plantio do milho e competem com esta cultura, como ocorre com o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) e outras gramíneas. Vale ressaltar que o milho já apresenta recomendação de bula para aplicação de 2,4-

D, porém apenas até o estágio V4, ou seja, com quatro folhas completamente expandidas.

Devido à maior abrangência de seletividade que o milho EnList™ apresenta, é necessário se atentar quanto ao controle das plantas voluntárias na entressafra, e também na lavoura subsequente, como a soja. Controles satisfatórios de milho EnList™ na pós-emergência da soja RR foram obtidos através de aplicações de glyphosate + clethodim e glyphosate + sethoxydim. Em contraste, misturas de glyphosate + alguns herbicidas do grupo FOP, resultaram em controles muito inferiores (até 9%), demonstrando sua diferença de susceptibilidade entre o grupo químico das ciclohexanodionas (DIMs), e os FOPs, que ambos consistem em ferramentas de manejo contra plantas daninhas da família Poaceae (SOLTANI; SHROPSHIRE; SIKKEMA, 2015).

## **2.5 Haloxyfop-methyl e 2,4-D**

Os herbicidas dos grupos químicos FOP e DIM (ciclohexanodionas) pertencem ao mecanismo de ação dos inibidores da enzima “acetil coenzima A carboxilase” (ACCase), a qual é responsável pela biossíntese de ácidos graxos, devido à catalização da reação que transforma acetyl-CoA em malonyl-CoA (DAYAN et al., 2015). A diferença de susceptibilidade entre espécies de folha larga e gramíneas se dá pelo fato destas últimas apresentarem apenas a forma eucariótica da enzima (SASAKI; NAGANO, 2004), a qual é inibida por ambos os grupos destes herbicidas. Plantas de folha larga apresentam, portanto, as duas formas da enzima, e apenas a procariótica é suficiente para a produção de lipídeos da planta.

Os sintomas se destacam em maior parte nas regiões meristemáticas, tanto das raízes como da parte aérea, correspondentes a pontos de crescimento da planta, devido à presença de células e tecidos mais jovens, e dessa forma as atividades da enzima ACCase nestas regiões são mais elevadas. Com isso, o crescimento é paralisado e as folhas se tornam arroxeadas ou cloróticas, e a bainha se destaca com maior facilidade (OLIVEIRA JR., 2011; ROMAN, et al. 2007).

O 2,4-diclorofenoxiacético ácido (2,4-D) se apresenta como um mimetizador de auxina, ou seja, uma auxina sintética de elevadas concentrações, que quando aplicada, leva a distúrbios de crescimento e um desbalanço hormonal na planta,

denominado “epinastia”, que se trata de um crescimento desordenado, devido à inibição do crescimento e divisão celular, levando assim à produção de etileno e por fim, morte da planta (OLIVEIRA JR., 2011).

Os sais de amina são as formulações mais comuns de 2,4-D vendidas no país, e a principal destas é a dimetilamina (DMA), no entanto, a formulação inserida no pacote tecnológico EnList™ será constituída pelo sal de colina, o qual se apresenta com uma menor pressão de vapor (constante de Henry=  $1,4 \cdot 10^{-16} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$  e pressão de vapor=  $1,4 \cdot 10^{-7}$ ) em comparação com a formulação DMA (constante de Henry=  $8,6 \cdot 10^{-6} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$  e pressão de vapor=  $5,5 \cdot 10^{-7}$ ) e portanto, menor volatilidade e menores riscos de deriva sobre culturas adjacentes (MARCHESI, 2016).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e informações gerais dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos em campo e casa-de-vegetação do Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), pertencente ao Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Câmpus Botucatu/SP.

Nos experimentos desenvolvidos em casa de vegetação, cada unidade experimental foi constituída por vasos com volume de 1,7 litros, preenchidos com substrato Carolina<sup>®</sup>, composto por turfa de esfagno, vermiculita, e casca de arroz carbonizada, e com as seguintes características: pH 5,7 ( $\pm 0,5$ ), densidade 155 kg m<sup>-3</sup>; e capacidade de retenção de água de 55%. Foram semeadas cinco sementes por vaso, e após sua germinação, as mesmas foram desbastadas, deixando-se apenas uma planta até o final dos ensaios. Quanto à irrigação, os vasos foram mantidos dentro de recipientes plásticos preenchidos com água.

A aplicação dos tratamentos foi realizada quando as plantas atingiam o estágio vegetativo V4, ou seja, com quatro folhas completamente expandidas. Para isso, foi utilizado um pulverizador estacionário, constituído por uma barra de 2 metros de largura, equipada com quatro pontas de pulverização do tipo leque, da série TeeJet e modelo: XR 110.02 VS, espaçadas em 0,5 m e posicionadas a 0,5 m de altura do alvo. A velocidade empregada foi de 1 m s<sup>-1</sup>, e foi proporcionada através de um conjunto composto por um motor elétrico e modulador de frequência. A pressão utilizada foi de 2,0 kgf cm<sup>-2</sup>, estabelecendo uma vazão de 0,65 L min<sup>-1</sup> por ponta e volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup> (Figura 1).

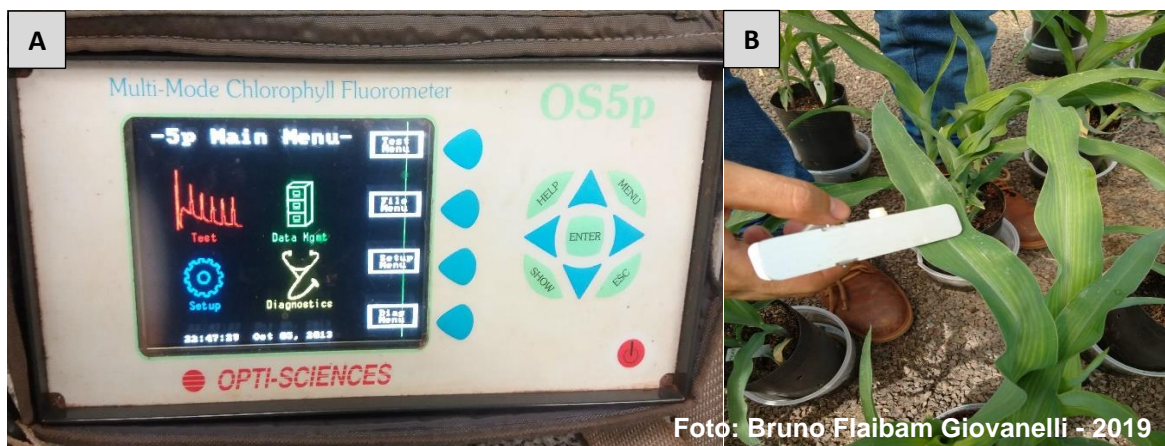
**Figura 1 - Aplicação dos Tratamentos**



Em todos os ensaios, foram realizadas avaliações da taxa de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR), em geral aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) dos herbicidas, utilizando-se um fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS5p – Opti Sciences), com duas leituras realizadas na última folha completamente expandida (Figura 2). Os resultados foram expressos em porcentagem em relação à testemunha, a qual foi considerada como 100%.

Nas mesmas datas de avaliação de ETR, também foram avaliadas a altura de plantas (da base à inserção da última folha), assim como notas de injúria visual para cada tratamento, envolvendo as cinco repetições, seguindo-se uma escala de 0 a 100%, na qual “0” representa ausência de injúrias, e “100” corresponde à morte das plantas (SBCPD, 1995).

**Figura 2 - Fluorômetro portátil (A) e avaliação de ETR (B)**



Ao final de cada experimento, ou seja 28 DAA, era realizada a coleta das plantas para secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, durante 72h, e sua posterior pesagem em balança analítica de precisão 0,0001 g para se obter a massa total de cada planta.

### 3.2 Experimentos 1 e 2 (casa de vegetação): Seletividade de herbicidas, isolados e em mistura, sobre milho com o gene *aad-1*

Foram realizado experimento em duplicata com o objetivo de avaliar a seletividade de alguns herbicidas que compõem o pacote tecnológico EnList™ sobre o milho com a referida tecnologia, tanto de forma isolada como em mistura. Dessa forma, os ensaios foram constituídos de oito tratamentos e cinco repetições, dispostos em delineamento inteiramente casualizado. O híbrido semeado em ambos os ensaios foi o 2B433 PW, fornecido diretamente pela empresa Corteva Agriscience e que apresenta o gene *aad-1*, com exceção ao gene *pat*, ou seja, o mesmo não é resistente apenas ao glufosinato de amônio. O material possui ciclo superprecoce e é recomendado tanto para plantio em safra de verão, como safrinha em grande parte do país, além de ser um híbrido de médio a elevado investimento (Dow AgroSciences, 2016).

Os tratamentos e suas respectivas doses podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1 - Tratamentos referentes aos experimentos realizados em casa de vegetação, sobre a seletividade de herbicidas em milho com o gene *aad-1*, 2019**

Tratamentos	Produto Comercial	Doses (g i.a ha <sup>-1</sup> )
1.testemunha	-	0
2.haloxyfop-methyl	Verdict® Mays	126*
3.glyphosate	Glizmax® Prime	960**
4.2,4-D	EnList™ Colex-D	912**
5.haloxyfop + glyphosate	Verdict + Glizmax	126 + 960
6.haloxyfop + 2,4-D	Verdict + EnList	126 + 912
7.glyphosate + 2,4-D	Glizmax + EnList	960 + 912
8.haloxyfop + 2,4-D + glyphosate	Verdict + EnList + Glizmax	126 + 912 + 960

\*: Nos tratamentos envolvendo haloxyfop, foi empregado o adjuvante Joint® Oil na concentração de 0,5% v/v; \*\*: Doses expressas em gramas de equivalente ácido por hectare (g e.a ha<sup>-1</sup>).

O primeiro ensaio foi aplicado no dia 24/11/2017, e as condições de aplicação foram: 28°C e 58% de umidade relativa (UR), e o segundo no dia 31/01/2018, a 26°C e 67% de UR.

### **3.2.1 Experimento em campo**

Além dos dois ensaios em casa de vegetação, foi realizado um experimento adicional para se avaliar a seletividade das mesmas moléculas, sobre o mesmo evento, porém em condições de campo. Neste ensaio, foram adicionados outros quatro tratamentos, envolvendo também o herbicida glufosinato de amônio, totalizando doze tratamentos (Tabela 2).

O experimento foi implantado em área experimental da Fazenda Lageado, pertencente à Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da UNESP/Botucatu. De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é classificado como “Cfa”, ou seja, quente e temperado (CUNHA; MARTINS, 2009). A análise de solo e os dados de precipitação pluvial, assim como de temperaturas máxima, média, e mínima estão representados na Tabela 3 e Figura 3, respectivamente.

As parcelas foram compostas por cinco linhas com quatro metros de comprimento, e espaçadas em 0,85 m. A área útil empregada correspondeu a dois metros de duas linhas centrais, isolando-se as extremidades. Todas as parcelas eram mantidas livre da presença de plantas daninhas. O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições, totalizando 48 parcelas.

**Tabela 2 - Tratamentos referentes ao experimento realizado em campo, com milho apresentando o gene *aad-1*. Safra 2019**

Tratamentos	Produto Comercial	Doses (g i.a ha <sup>-1</sup> )
1.testemunha	-	0
2.haloxyfop-methyl	Verdict® Mays	126*
3.glyphosate	Glizmax® Prime	960**
4.2,4-D	EnList™ Colex-D	912**
5.glufosinato de amônio	Finale	600
6.halo + gly	Verdict + Glizmax	126 + 960
7.halo + 2,4-D	Verdict + EnList	126 + 912
8.halo + glu	Verdict + Finale	126 + 600
9.gly + 2,4-D	Glizmax + EnList	960 + 912
10.gly + glu	Glyzmax + Finale	960 + 600
11.2,4-D + glu	EnList + Finale	912 + 600
12.2,4-D + glu + gly + halo	Verdict + EnList + Glizmax	912 + 600+ 960 + 126

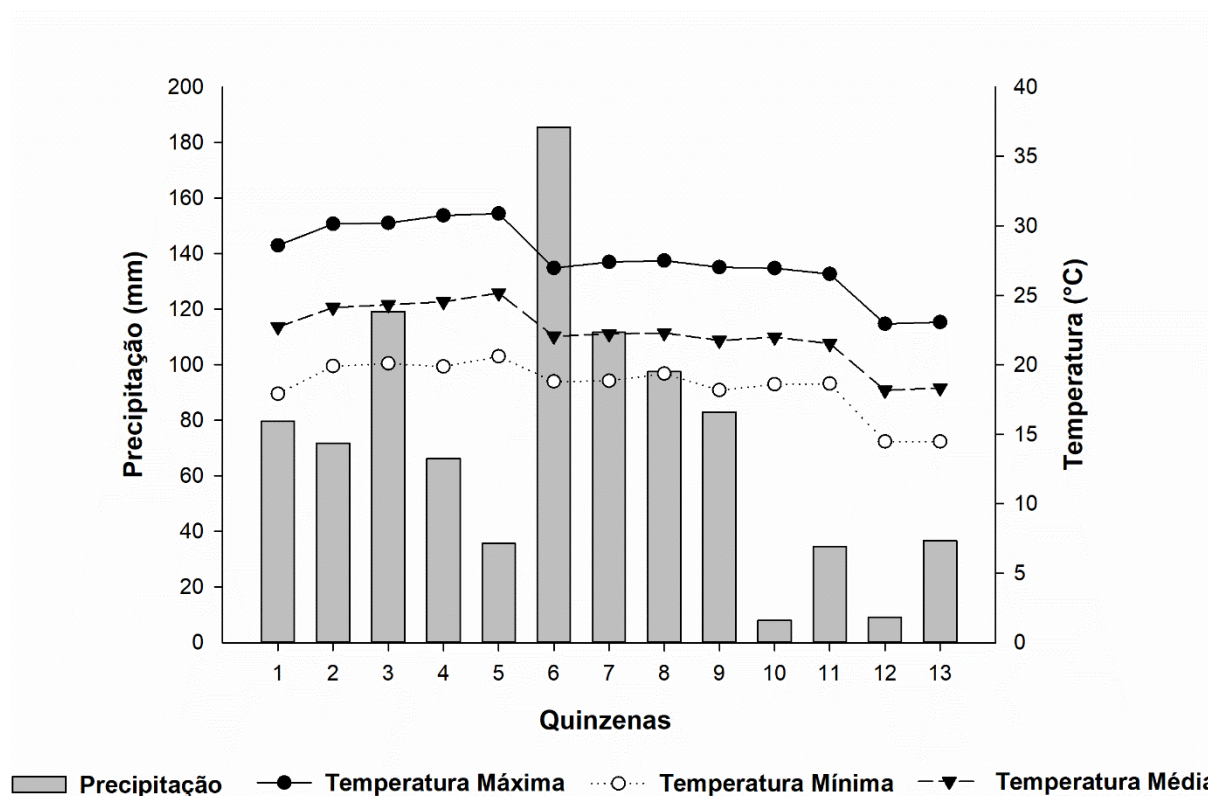
\*: Nos tratamentos envolvendo haloxyfop, foi empregado o adjuvante Joint® Oil na concentração de 0,5% v/v; \*\*: Doses expressas em gramas de equivalente ácido por hectare (g e.a ha<sup>-1</sup>). halo: haloxyfop-methyl; gly: glyphosate; glu: glufosinato de amônio.

**Tabela 3 - Análise química e física do solo da área experimental, coletada na profundidade de 0-20 cm. Botucatu, SP**

pH (CaCl <sub>2</sub> )	Al	H+Al	P (resina)	K	Ca	Mg	SB	CTC	V
4,7	2,0	55,0	9,0	1,99	16,0	9,0	28,0	83,0	33,0
	Argila			Silte			Areia		
	58,3			21,5			20,1		

Unidades: Al, H+Al, K, Ca, Mg, SB e CTC (mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>); P (resina) (mg dm<sup>-3</sup>); V, argila, silte, areia (%).

**Figura 3 - Representação da precipitação e temperaturas máximas, médias e mínimas durante o período de condução do experimento. Botucatu, SP**



A semeadura ocorreu no dia 15/01/2019, com as sementes previamente tratadas com inseticida. A área foi previamente gradeada, e no momento do plantio, a cultura recebeu uma adubação de 250 kg ha<sup>-1</sup> do formulado 08-28-16 (NPK) na base, e ao atingir o estágio V3, uma cobertura nitrogenada de 200 kg ha<sup>-1</sup> de uréia, com aplicação localizada na linha de plantio.

A aplicação dos tratamentos ocorreu quando a cultura atingiu o estágio vegetativo V4, e para isso, foi empregado um pulverizador costal propelido a CO<sub>2</sub>, a uma pressão constante de 2 Bar, equipado com uma barra composta por 6 pontas do tipo leque, da marca TeeJet, e modelo XR 110.02, operando a uma altura de 0,5 metros do alvo e velocidade de 1m.s<sup>-1</sup>, proporcionando um volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>.

As avaliações realizadas estão relacionadas ao desempenho agrônomo da cultura, e foram mensuradas quando a mesma atingiu o seu ponto de maturidade fisiológica (após R6). As variáveis obtidas foram: altura total de plantas, altura de

inserção da espiga, número de fileiras de grãos, número de grãos por fileira, comprimento da espiga, massa de 100 grãos, e produtividade.

Durante as avaliações de altura (total e de inserção da espiga), foram medidas oito plantas da área útil de cada parcela, considerando-se a altura total como a distância entre o nível do solo à inserção da última folha completamente expandida. As avaliações de número de fileiras de grãos, número de grãos por fileira, e comprimento das espigas foram realizadas após a colheita manual das mesmas, e para isso, foi retirada a palha de três espigas por parcela.

Após estas avaliações, o material foi debulhado em trilhadora elétrica estacionária, e o total de grãos por parcela foi pesado para se obter a estimativa de produtividade. Em seguida, as amostras foram levadas ao laboratório para que fosse obtida a massa de 100 grãos, através da contagem manual de dois lotes por amostra, totalizando duas repetições por parcela. Em ambas as variáveis, a umidade final dos grãos foi corrigida para 13%.

Os resultados inerentes a este experimento serão demonstrados e discutidos de forma conjunta aos experimentos 1 e 2.

### **3.3 Experimentos 3 e 4: Doses de 2,4-D aplicadas sobre milho com o gene *aad-1* e sua isolinha**

Estes ensaios tiveram como objetivo avaliar a resistência do milho com o gene *aad-1* (2B433 PW) ao herbicida 2,4-D, e compará-lo à sua isolinha sem este gene, ou seja, o mesmo híbrido, porém sem a tecnologia EnList™. Para isso, os mesmos foram semeados de forma concomitante, e da mesma forma ocorreu a aplicação dos tratamentos, que foram compostos pelas seguintes doses do herbicida: 0; 456; 912; 1.824; 3.648; e 7.296 gramas de equivalente ácido por hectare (g e.a ha<sup>-1</sup>) de 2,4-D. O produto empregado foi o EnList™ Colex-D™, que apresenta concentração de 456 g e.a L<sup>-1</sup>, formulado com sal de colina.

O primeiro ensaio foi aplicado no dia 09/02/2018, a 28°C e 68% de UR, e o segundo no dia 08/05/2018, com 26°C e 60% de UR. As avaliações realizadas foram as mesmas descritas no início desta seção.

### 3.4 Experimentos 5 e 6: Doses de haloxyfop-methyl aplicadas sobre milho com o gene *aad-1* e sua isolinha

Estes ensaios tiveram como objetivo avaliar a resistência do milho com o gene *aad-1* (2B433 PW) ao herbicida haloxyfop-methyl, e compará-lo à sua isolinha. Dessa forma, os materiais foram semeados, deixando-se três plantas por vaso devido à realização de análises de extrato etéreo. As plantas foram submetidas às seguintes doses do herbicida: 0; 63; 126; 252; 504 e 1008 g i.a ha<sup>-1</sup>. O produto utilizado foi o Verdict Mays, com concentração de 540 g i.a L<sup>-1</sup>, e em todos os tratamentos foi adicionado o adjuvante óleo mineral Joint® Oil, na concentração de 0,5% v/v.

O experimento 5 foi aplicado no dia 21/03/2018, e as condições foram de 24°C e 59% de UR. O ensaio 6 recebeu aplicação no dia 16/05/2018, e as condições foram de 26°C e 62% de UR. Além da avaliação das variáveis mencionadas anteriormente, avaliou-se também o teor total de lipídeos (extrato etéreo).

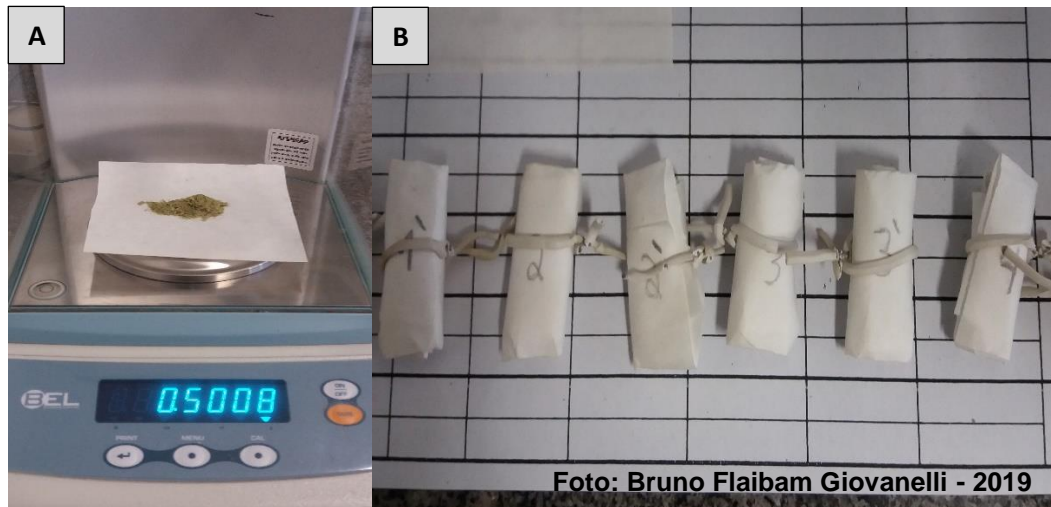
#### 3.4.1 Extrato Etéreo

Neste estudo, foram realizadas algumas análises para quantificar o teor total de lipídeos através da determinação de extrato etéreo, ou gordura bruta, empregando-se o método de Soxhlet, proposto por Silva (1990) o qual extrai todas as substâncias apolares presentes na planta, inclusive o conteúdo total de lipídeos. Para isso, as avaliações ocorreram no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP/Botucatu.

As amostras eram referentes a dois períodos diferentes após a aplicação do herbicida: 7, 14 e 28 DAA. No entanto, para esta análise foram avaliados apenas dois tratamentos: testemunha e a dose 126 g i.a ha<sup>-1</sup>.

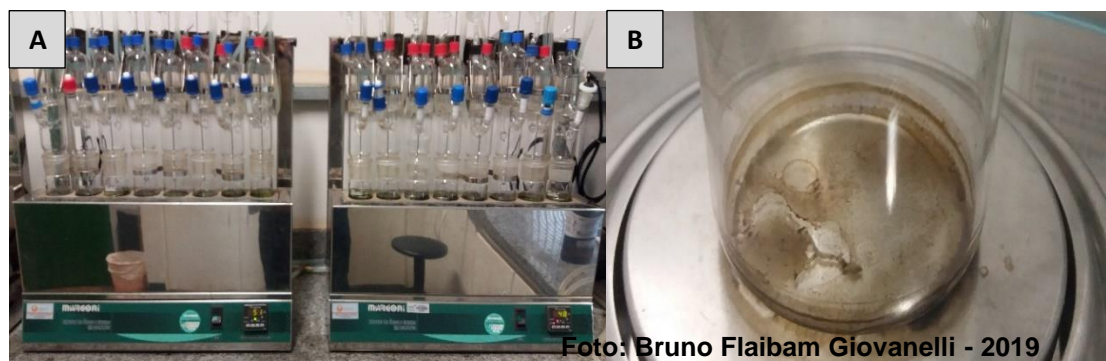
A análise consistiu na coleta e secagem das plantas inteiras em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, durante 72h, até peso constante, para que posteriormente ocorresse a sua moagem. Foi utilizada uma alíquota de 0,5 a 1,0 g do material moído, e o mesmo foi embrulhado em papel de filtro, formando uma espécie de “cartucho” (Figura 4). Cada repetição foi analisada em duplicata, ou seja, totalizando 60 cartuchos para os dois tratamentos e três períodos de avaliação, com cinco repetições cada.

**Figura 4 - Pesagem das amostras (A) e cartuchos para extração (B)**



Os cartuchos foram então mergulhados em frascos de vidro com peso previamente conhecido, contendo aproximadamente 40 mL de éter de petróleo, e posteriormente colocados em um condensador por 4 a 6 horas a 50°C, para ocorrer a extração do teor de gordura, e parte do éter foi recuperado no sistema, podendo ser também reutilizado (Figura 5).

**Figura 5 - Extração das amostras (A) e gordura remanescente no tubo (B)**



Após a extração, os cartuchos foram retirados dos frascos, e estes foram mantidos no condensador até a recuperação de parte do éter remanescente. Em seguida, os tubos foram levados à estufa de 60°C para a sua total secagem, restando apenas gordura. Em sequência, foram colocados em dessecador para que

atingissem a temperatura ambiente, evitando-se ganhos de umidade. No final, foram pesados em balança de precisão com quatro casas decimais, e a diferença entre o tubo vazio e o mesmo com gordura representa o teor de extrato etéreo (Figura 5).

No entanto, o valor real da porcentagem de extrato etéreo foi dado em relação ao teor de matéria seca de cada amostra. Para isso, uma alíquota de 2 a 3 gramas das mesmas foi colocada em cadinho metálico com peso conhecido, e seca em estufa a temperatura de 105°C, durante aproximadamente 24h, e em seguida colocadas em dessecador para que fossem pesadas novamente. Assim, calculou-se o teor de extrato etéreo com base na porcentagem de matéria seca obtida.

### **3.5 Experimento 7: Doses de glyphosate aplicadas sobre milho com o gene *aad-1* e sua isolinha**

Este ensaio teve como objetivo avaliar a resistência, tanto do milho com o gene *aad-1*, como de sua isolinha, ao herbicida glyphosate. Neste experimento, as doses utilizadas foram: 0; 480; 960; 1.920; 3.840 e 5.760 g e.a ha<sup>-1</sup>, e o produto comercial empregado foi o Glizmax<sup>®</sup> Prime, também pertencente à empresa Corteva Agriscience, e formulado com sal de isopropylammonium, na concentração de 480 g e.a.L<sup>-1</sup>. As avaliações foram as mesmas realizadas nos demais ensaios, e a aplicação ocorreu no dia 12/02/2019, nas condições de 29°C e 61% de UR.

### **3.6 Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), exceto para os dados de fitointoxicação, sobre os quais foram calculadas apenas as médias. Quanto à variável extrato etéreo, foi aplicado o mesmo teste, porém a análise ocorreu de modo fatorial (2x2), ou seja, duas doses de haloxyfop-methyl e dois períodos de avaliação.

Foram utilizados os programas Sisvar<sup>®</sup> (versão 5.6) para análise estatística e Sigma Plot<sup>®</sup> (versão 12.5) para a elaboração de gráficos. Quanto as variáveis analisadas, estabeleceu-se o intervalo de confiança pelo teste t ( $p \leq 0,05$ ), utilizando a equação:

$$IC = (t * DP) / \sqrt{n}$$

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

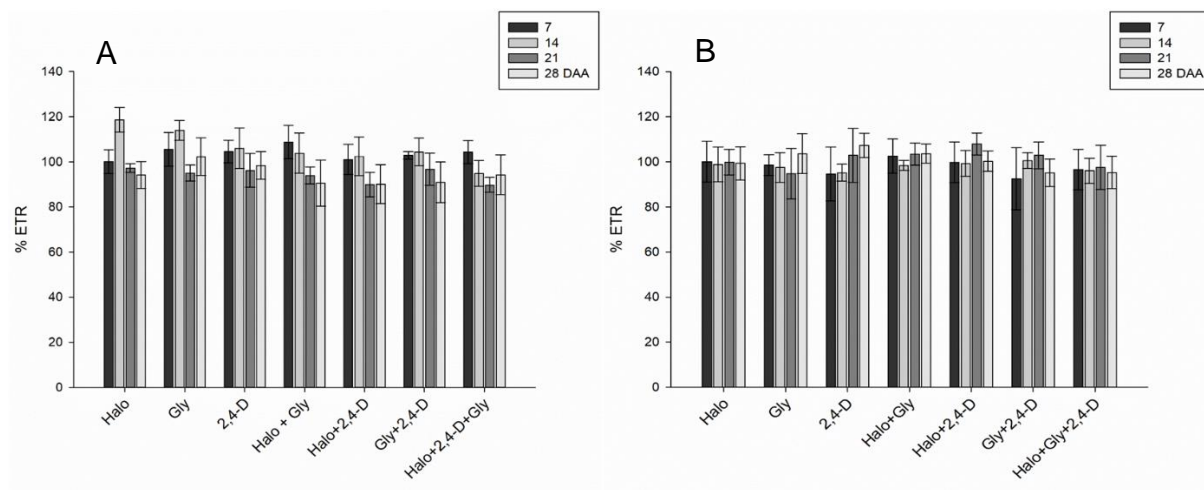
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimentos 1 e 2 (casa de vegetação): Seletividade de herbicidas, isolados e em mistura, sobre milho com o gene *aad-1*

A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi mensurada até os 28 DAA, e permitiu avaliar o comportamento de todos os tratamentos através desta variável (Figura 6). Em ambos os ensaios, não foram encontradas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para a variável ETR.

A análise da fluorescência é um método que oferece muitas vantagens como instrumento qualitativo para o estudo do transporte de elétrons durante a fotossíntese, visto que a obtenção de medidas da fluorescência da clorofila é rápida, específica e não destrutiva (MOHANTY, 1974). Esta variável representa uma das formas de dissipação luminosa ocorrida nas folhas, ou seja, uma energia que a planta não foi capaz de utilizar e pode ser dissipada através de calor e fluorescência (BAKER, 2008).

**Figura 6 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA) dos tratamentos, nos experimentos 1 (A) e 2 (B)**



- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ); Letras iguais dentro de cada período de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); Halo: haloxyfop-methyl; Gly: glyphosate

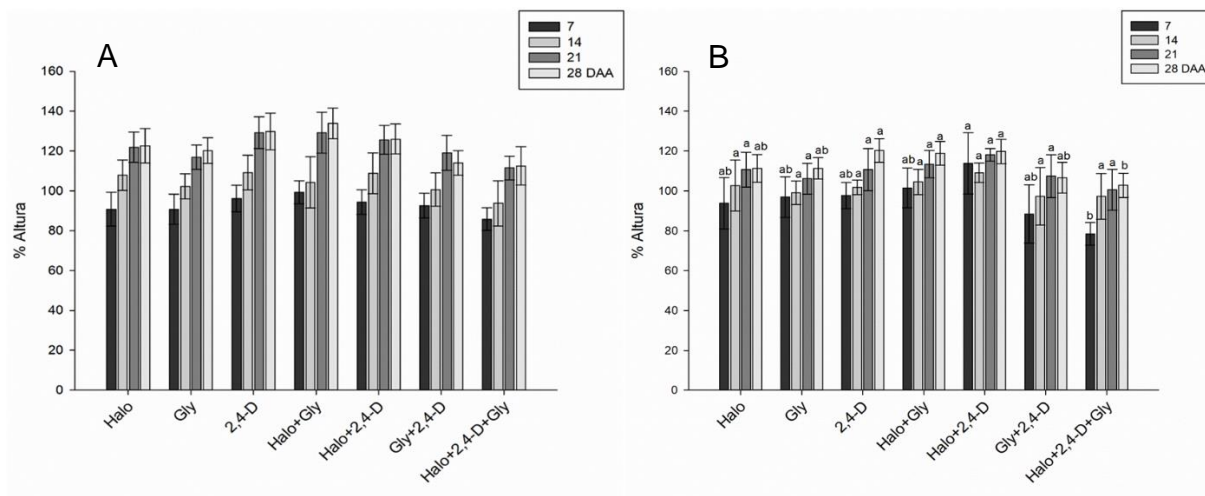
É possível notar que todos os tratamentos apresentaram valores próximos em relação à testemunha em ambos os experimentos. No ensaio 1, as maiores reduções de ETR ocorreram nos tratamentos: haloxyfop-methyl + 2,4-D, e no último, correspondente à mistura tripla, com reduções próximas a 11% aos 21 DAA (Figura 6A). No experimento 2, as maiores reduções se deram também no tratamento envolvendo a mistura tripla de herbicidas, com valores permanecendo em torno de 95 a 97% em relação a testemunha para todas as avaliações (Figura 6B), no entanto, não ocorreram diferenças significativas a  $p \leq 0,05$  entre os tratamentos, para ambos os ensaios.

Este fato pode estar relacionado ao evento apresentar um único gene (*aad-1*), capaz de degradar tanto a molécula de 2,4-D, como de haloxyfop-methyl. Portanto, ao se aplicar ambos os herbicidas em mistura, pode ter ocorrido certo efeito de saturação na rota metabólica de degradação das duas moléculas, ou seja, uma possível diminuição na capacidade da enzima aryloxyalkanoato-dioxygenase em degradar os herbicidas de forma conjunta.

Porém, convém ressaltar para a possibilidade de antagonismo entre as moléculas de 2,4-D e haloxyfop, que quando misturadas, existem relatos da possibilidade de perda de eficácia do graminicida, devido a uma menor translocação ou mesmo maior metabolização do mesmo, proporcionada pelo 2,4-D, através do aumento da atividade do citocromo P450 (HAN et al., 2013). No entanto, este efeito não ocorre em todos os casos, pois Maciel et al., (2013), ao testar o controle de milho RR<sup>®</sup> voluntário através de haloxyfop-methyl tanto isolado como em mistura com 2,4-D, demonstrou controles satisfatórios em todos os tratamentos.

Com relação à altura, no experimento 1, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 7A). Aos 7 DAA, todos se apresentaram com porcentagens abaixo de 100% em relação ao valor correspondente à testemunha. O menor valor foi obtido pela mistura tripla de herbicidas, fato que se repetiu nas demais avaliações.

**Figura 7 - Valores relativos (% em relação à testemunha) de altura aos 7, 14, 21 e 28 DAA dos tratamentos, para os experimentos 1 (A), e 2 (B)**

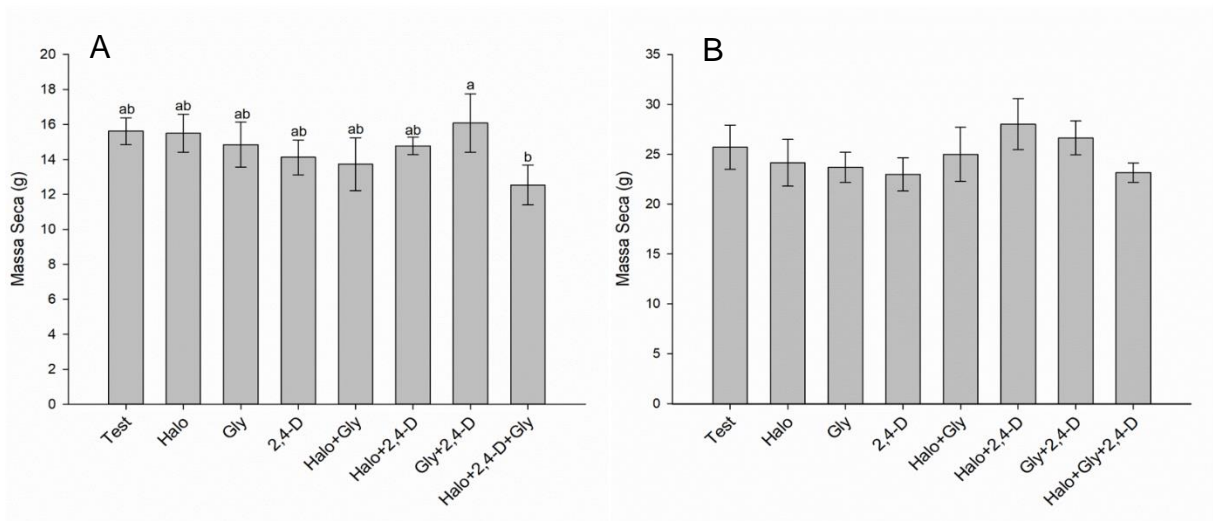


- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ); Letras iguais dentro de cada período de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); Halo: haloxyfop-methyl; Gly: glyphosate

No experimento 2, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, porém com a mesma tendência de comportamento do ensaio 1, em que a associação dos três herbicidas demonstrou menores valores de altura em todos os períodos de avaliação, destacando-se para os 7 DAA, com 78% de altura em relação à testemunha, ou seja, 22% de redução, mas com recuperação durante os períodos subsequentes (Figura 7B).

Os valores de massa seca demonstraram tendências parecidas em ambos os ensaios. No primeiro, é possível observar diferença significativa entre o último tratamento (haloxyfop-methyl + 2,4-D + glyphosate) em relação à mistura de glyphosate + 2,4-D, porém, a mistura tripla não difere de forma significativa dos demais tratamentos, incluindo-se a testemunha sem aplicação. Além destas variáveis, não foram observados sintomas de fitointoxicação que pudessem ser ocasionados pelos tratamentos.

**Figura 8 - Massa Seca (em gramas) dos tratamentos aos 28 dias após aplicação (DAA) nos experimentos 1 (A) e 2 (B)**



- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ); Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); Test: testemunha; Halo: haloxyfop-methyl; Gly: glyphosate

#### 4.1.1 Experimento em campo

Na análise do experimento realizado a campo, observa-se que não houve diferença significativa para as variáveis de desempenho agrônomo (Tabela 4). Outro parâmetro a ser mencionado foi a ausência de sintomas visuais de fitointoxicação. A variável “número de fileiras de grãos” não foi afetada, neste caso, pela aplicação dos tratamentos, haja visto que a definição desta variável ocorre naturalmente em torno do estágio V5 (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014). Devido a isso, é conveniente mensurar esta variável após a aplicação de alguns herbicidas em pós-emergência.

**Tabela 4 - Resultados inerentes ao experimento realizado em campo, sobre variáveis relacionadas ao desempenho agrônômico do milho com o gene *aad-1*. Botucatu, 2019**

Tratamentos	AIE <sup>NS</sup>	AT <sup>NS</sup>	NFG <sup>NS</sup>	NG/F <sup>NS</sup>	CE <sup>NS</sup>	M100 <sup>NS</sup>	PRO <sup>NS</sup>
1. Testemunha	1,14	2,05	18,50	34,33	15,87	24,24	8.272,57
2. Haloxypop	1,11	2,07	18,50	34,75	15,50	24,24	6.839,20
3. Glyphosate	1,18	2,08	18,66	34,58	16,25	24,32	7.968,84
4. 2,4-D	1,09	2,00	17,83	35,08	15,66	23,56	7.904,00
5. Glufosinato de amônio	1,13	2,07	18,33	33,08	15,50	24,07	8.262,33
6. Halo + Gly	1,14	2,05	18,16	32,41	15,16	23,48	6.839,20
7. Halo + 2,4-D	1,13	2,06	17,50	34,08	16,30	24,83	8.020,03
8. Halo + Glu	1,10	2,02	17,25	35,83	17,08	24,07	7.842,56
9. Gly + 2,4-D	1,12	2,08	17,83	35,0	16,33	24,32	7.822,10
10. Gly + Glu	1,10	2,05	19,16	34,33	15,80	23,73	8.692,34
11. 2,4-D + Glu	1,06	1,95	18,83	33,49	15,80	24,32	7.924,47
12. 2,4-D + Glu + Gly + Halo	1,12	2,07	17,16	36,0	16,16	23,73	8.736,71
Média	1,12	2,05	18,14	34,41	15,95	24,07	7.927,03
DMS	0,12	0,21	3,12	5,71	2,71	3,03	2.877,37
C.V. (%)	4,33	4,26	6,93	6,69	6,86	5,07	14,62

AIE: Altura de Inserção da Espiga (m); AT: Altura Total de Plantas (m); NFG: Número de Fileiras de Grãos; NG/F: Número de Grãos por Fileira; CE: Comprimento da Espiga (cm); M100: Massa de Cem Grãos (g); PRO: Produtividade (kg.ha<sup>-1</sup>); <sup>NS</sup>: Não significativo pelo teste de Tukey a p≤0,05.

O número de grãos por fileira, em geral, apresenta elevada relação com o comprimento da espiga, a qual é definida quando a planta atinge o estágio de 12 folhas (V12) (DOURADO NETO; FANCELLI, 1997). Com relação à produtividade, é possível observar semelhança entre os valores dos tratamentos envolvendo haloxypop isolado, e o mesmo associado com glyphosate. Estes valores, mesmo não apresentando diferenças significativas, estão abaixo do resultado encontrado na testemunha, demonstrando a necessidade de mais estudos com relação a este tratamento.

Ruen et al. (2017), não encontrou diferenças significativas na produtividade de milho com o gene *aad-1*, submetido a diversos manejos e duas doses diferentes da mistura de glyphosate + 2,4-D. Porém, quando aplicado o dobro da dose, foi possível observar leves injúrias iniciais, as quais foram recuperadas com o desenvolvimento da cultura, proporcionado também por condições ambientais adequadas. No presente estudo, o somatório de precipitação durante o ciclo da cultura superou 900 milímetros (mm), representando um regime hídrico superior ao exigido para o milho, que corresponde a um intervalo entre 400 e 600 mm (FANCELLI, 2015), auxiliando na rápida recuperação de possíveis sintomas causado pelos herbicidas.

Os resultados, em geral, mostram que o evento apresenta um único gene (*aad-1*), que é resistente a mais de um mecanismo de ação de herbicida (inibidores da ACCase – aryloxyphenoxypropionatos, e mimetizadores de auxina), além dos genes *pat* e *cp4-epsps*, que conferem resistência ao glufosinato de amônio e glyphosate, respectivamente, demonstrando que as aplicações isoladas das moléculas, e as misturas duplas, incluindo haloxyfop-methyl + 2,4-D, não causaram reduções significativas dos parâmetros avaliados.

Em termos de seletividade, Wright et al. (2010) ao aplicarem 2,4-D (3.360 g e. a ha<sup>-1</sup>) em pré e pós-emergência da cultura do milho (estádios V4 e V8), também não observaram reduções nos parâmetros avaliados, além de relatarem que o estágio de aplicação não influenciou na seletividade do 2,4-D para o milho com o gene *aad-1*. Em complemento, Chahal et al. (2015) afirma que a mistura formulada de glyphosate + 2,4-D, denominada comercialmente EnList Duo™ deverá ser aplicada na cultura do milho EnList™ até o estágio V8, ou até que o mesmo atinja a altura máxima de 76 centímetros.

Krenchinski et al. (2017) demonstraram em um de seus ensaios, que a mistura tripla, envolvendo: glyphosate + glufosinato de amônio + atrazine, sobre milho com os genes *pat* e *cp4 epsps* não alterou variáveis, como índice de clorofila e altura de plantas, no entanto, causou redução de produtividade da cultura em maiores doses, mas os tratamentos não diferiram de forma significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação à testemunha.

Em outro trabalho, Silva et al. (2017) encontraram leve porcentagem de fitointoxicação em alguns tratamentos envolvendo a aplicação isolada e associada de glyphosate, glufosinato de amônio, e atrazine em pós-emergência do milho, até os 14 DAA, porém todos os tratamentos não interferiram de forma negativa sobre parâmetros fisiológicos, como índice de clorofila, assim como na altura de plantas, massa de 100 grãos e produtividade.

Giovanelli et al. (2018), ao testarem na pós-emergência de dois híbridos de milho, os herbicidas glyphosate, atrazine e nicosulfuron, encontraram maior fitointoxicação até os 14 DAA na mistura envolvendo os três herbicidas, porém com posterior recuperação de sintomas, e sem prejuízos à produtividade assim como na altura de plantas, índice de clorofila, e massa de 1.000 grãos. Neste caso, a maior porcentagem de fitointoxicação pode se dar devido à presença do nicosulfuron, o qual

pode causar injúrias iniciais, dependendo do estágio de aplicação e do híbrido utilizado (BEVILAQUA, 2019).

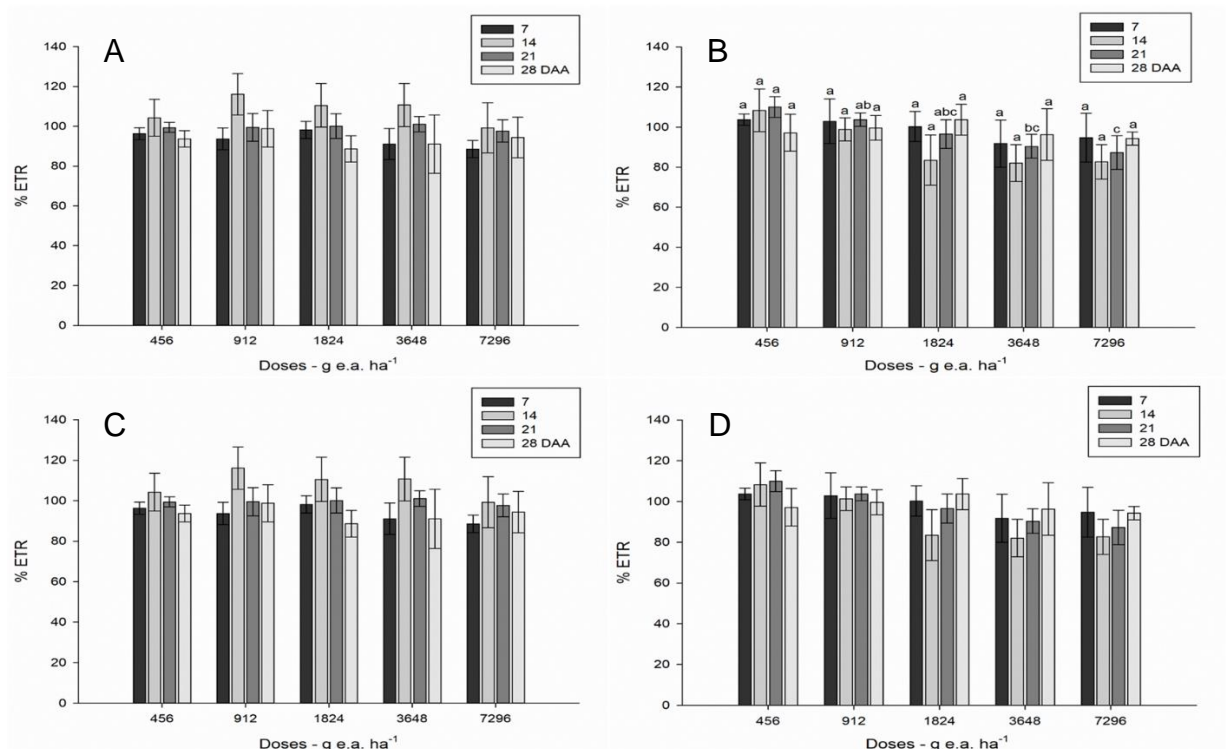
Pawelkiewicz (2018) encontrou elevadas porcentagens de fitotoxicidade em misturas envolvendo 2,4-D, na dose de 1.209 g i.a ha<sup>-1</sup>, e demais herbicidas, dentre estes o glyphosate, na pós-emergência do milho (V4), sem o gene *aad-1*. As maiores porcentagens encontradas aos 28 DAA ocorreram na mistura de 2,4-D + tembotrione, e esta mesma associada com nicosulfuron, ambas apresentando 32% de injúria, com pouca influência sobre diversas variáveis, como: comprimento e diâmetro da espiga. Porém, a produtividade se mostrou com reduções significativas em relação a testemunha capinada, o que demonstra a necessidade de conhecimento das misturas a serem empregadas, e seus possíveis efeitos negativos sobre a cultura.

Dessa forma, são importantes que sejam realizados mais estudos com relação ao efeito de misturas envolvendo duas ou mais moléculas sobre parâmetros fisiológicos e produtivos da cultura do milho com o gene *aad-1*, principalmente as moléculas registradas para híbridos com a tecnologia EnList™, e também suas interações com demais herbicidas já registrados e utilizados pelo produtor, para esta cultura.

#### **4.2 Experimentos 3 e 4: Diferentes doses de 2,4-D aplicadas sobre milho com o gene *aad-1* e sua isolinha**

A fluorescência de clorofila pode ser empregada no estudo de diversos estresses causados à planta, dentre estes a intoxicação causada por herbicidas, os quais podem alterar o processo fotossintético (ZHAO et al., 2018). Alguns herbicidas não atuam diretamente nos Fotossistemas (I e II), porém podem acarretar em danos indiretos aos mesmos devido a sua atuação em outras rotas metabólicas, diminuindo assim a taxa de transporte de elétrons (JUNEAU; QIU; DEBLOIS, 2007).

**Figura 9 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 DAA de 2,4-D, nos experimentos 3 (A e B) e 4 (C e D), no material com gene *aad-1* (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D)**



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

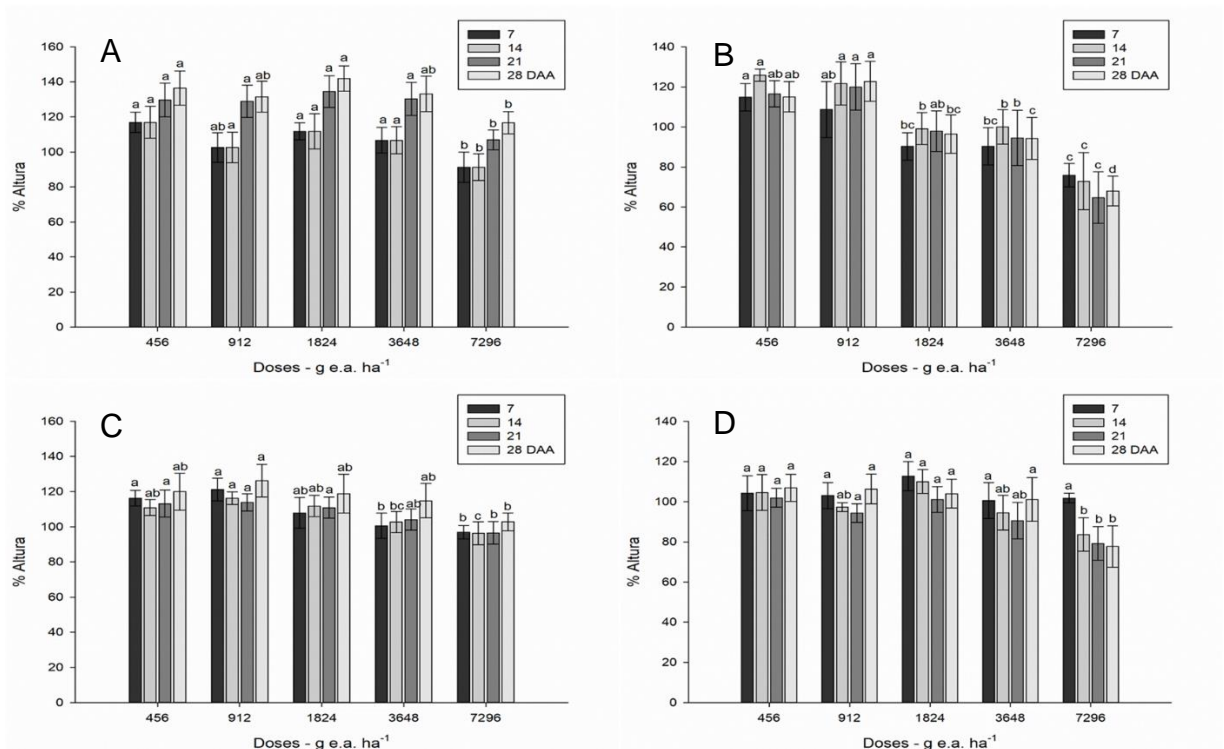
De acordo com os resultados presentes nos gráficos da Figura 9, foi possível observar determinadas respostas quanto à taxa de transporte de elétrons do Fotossistema II. Em ambos os experimentos, é possível notar que a aplicação do herbicida não ocasionou efeitos de redução da porcentagem de ETR para o material com o gene *aad-1* (Figuras 9A e 9C).

Em contraste, as doses 912; 1.824 e 3.648 g e.a ha<sup>-1</sup> proporcionaram aumentos superiores a 10% nos valores de ETR em relação a testemunha, aos 14 DAA, nos dois ensaios para o material com o gene *aad-1*. Porém, isso não é observado no tratamento referente à dose mais elevada (7.296 g e.a ha<sup>-1</sup>), que permaneceu com valores próximos à testemunha. Este fato pode ter ocorrido devido a um possível estímulo na taxa de transporte de elétrons, ocasionado pela aplicação do herbicida, que se elevou até determinada dose, e decresceu no último tratamento, devido a uma provável intoxicação causada pela molécula.

Barbagallo et al. (2003), ao testar diversos parâmetros relacionados à fluorescência de clorofila após aplicação de 2,4-D em plantas de *Arabidopsis* sp, não encontrou diferenças significativas para os mesmos às 6 e 48 horas após aplicação. Da mesma forma, Dayan e Zaccaro (2012) demonstraram baixas respostas nos valores de ETR em plântulas de pepino, após algumas horas de exposição ao 2,4-D, tanto após períodos de escuro, como em plena luz.

Com relação à isolinha do experimento 3 (Figura 10B), observou-se reduções na porcentagem de ETR nos tratamentos representados pelas maiores doses, aos 14 DAA. Porém, estas reduções observadas neste período de avaliação não diferem de forma significativa entre si a  $p \leq 0,05$ , ou seja, permanecem equiparadas à testemunha sem aplicação. No entanto, diferenças significativas de ETR são observadas aos 21 DAA, com um decréscimo diretamente proporcional ao aumento das doses aplicadas, resultando em uma diminuição de 13% em relação à testemunha para a maior dose. No experimento 4 (Figura 10D), as mesmas reduções ocorreram já aos 14 DAA (18% para a maior dose), e se mantiveram com 13% aos 21 DAA no mesmo tratamento.

**Figura 10 - Valores relativos (% em relação à testemunha) de altura aos 7, 14, 21 e 28 DAA de 2,4-D, para os experimentos 3 (A e B) e 4 (C e D), no material com o gene *aad-1* (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D)**



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

Com relação à porcentagem de altura de plantas, é possível notar que de modo geral, esta variável não decresceu a valores abaixo da testemunha sem aplicação para as doses mais inferiores em ambos os experimentos, no material com o gene *aad-1* (Figuras 10A e 10C). Porém, observa-se que no tratamento envolvendo a dose mais elevada, a altura diminuiu de forma significativa ( $p \leq 0,05$ ) em ambos os experimentos, acompanhando o comportamento da ETR, que ficou abaixo de 100% neste tratamento, para os dois ensaios.

No experimento 3 (Figura 10A), é possível notar incrementos superiores a 20% para os valores de altura inerentes ao material com o gene *aad-1*, entre as avaliações de 14 e 21 DAA. No entanto, estes valores são menores no experimento 4 (Figura 10C), permanecendo com incrementos em torno de 10% superiores à testemunha.

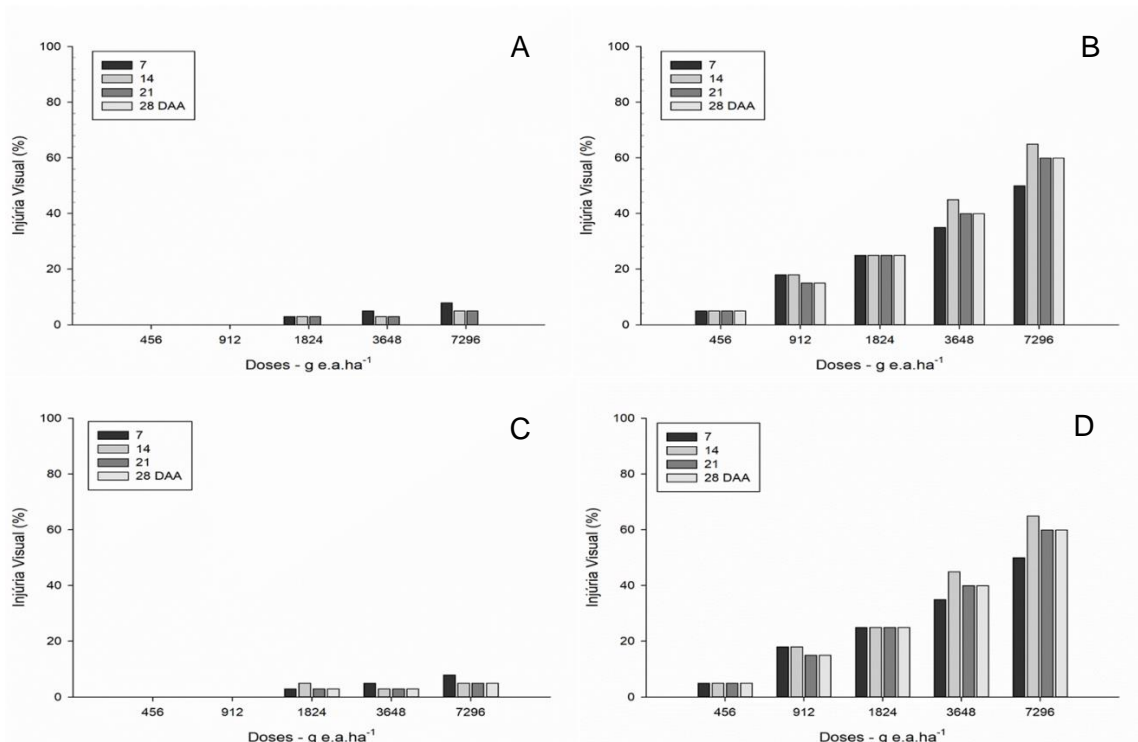
Quanto à isolinha, são observadas maiores diminuições de altura, devido a maior susceptibilidade desta em maiores doses, mesmo para a cultura do milho, que pertence à família Poaceae, sobre as quais o herbicida 2,4-D se apresenta como

seletivo. No experimento 3 (Figura 10B), é possível notar certo incremento de altura nas primeiras doses aplicadas (456 e 912 g e.a ha<sup>-1</sup>), sendo estes aumentos de 15 e 22% aos 28 DAA, respectivamente, o que corrobora com Reis et al. (2010), ao obter incremento de altura após a aplicação de diferentes doses de 2,4-D sobre plantas de milho.

Grossmann (2010) afirma que aplicações de 2,4-D em baixas doses, podem levar a estímulos de crescimento e acelerar demais processos de desenvolvimento da planta, devido a ser uma auxina sintética, ou seja, um hormônio de crescimento. Dessa forma, devido à presença do gene *aad-1*, e junto à maior capacidade natural do milho em metabolizar esta molécula, aplicações de doses mais elevadas de 2,4-D não ocasionaram danos de crescimento, mas sim o oposto, ou seja, um incremento na altura e na taxa de transporte de elétrons.

De acordo com Oliveira Jr (2011), a tolerância de gramíneas ao 2,4-D se dá devido a vários fatores, como: menor penetração do produto, assim como menor translocação pelos tecidos do floema. Skelton et al. (2017) afirma que o milho sem a presença do gene *aad-1* é capaz de degradar o 2,4-D através da hidroxilação do anel desta molécula, o que é mediado pelo citocromo P450 (SIMINSZKY, 2006), e a atividade deste último é induzida pela aplicação de 2,4-D (HAN et al., 2013).

**Figura 11 - Porcentagem de injúria visual, aos 7, 14, 21 e 28 DAA de 2,4-D, para os experimentos 3 (A e B) e 4 (C e D), no material com o gene *aad-1* (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D)**



Quanto à porcentagem de injúria visual, é possível notar leve fitointoxicação nos tratamentos referentes às três maiores doses no material com o gene *aad-1* (A e C), a qual permaneceu com valores entre 5 e 8%, e o principal sintoma observado ocorreu na maior dose, através de um amarelecimento da folha que recebeu o herbicida, que pode ser observado na Figura 12 a seguir.

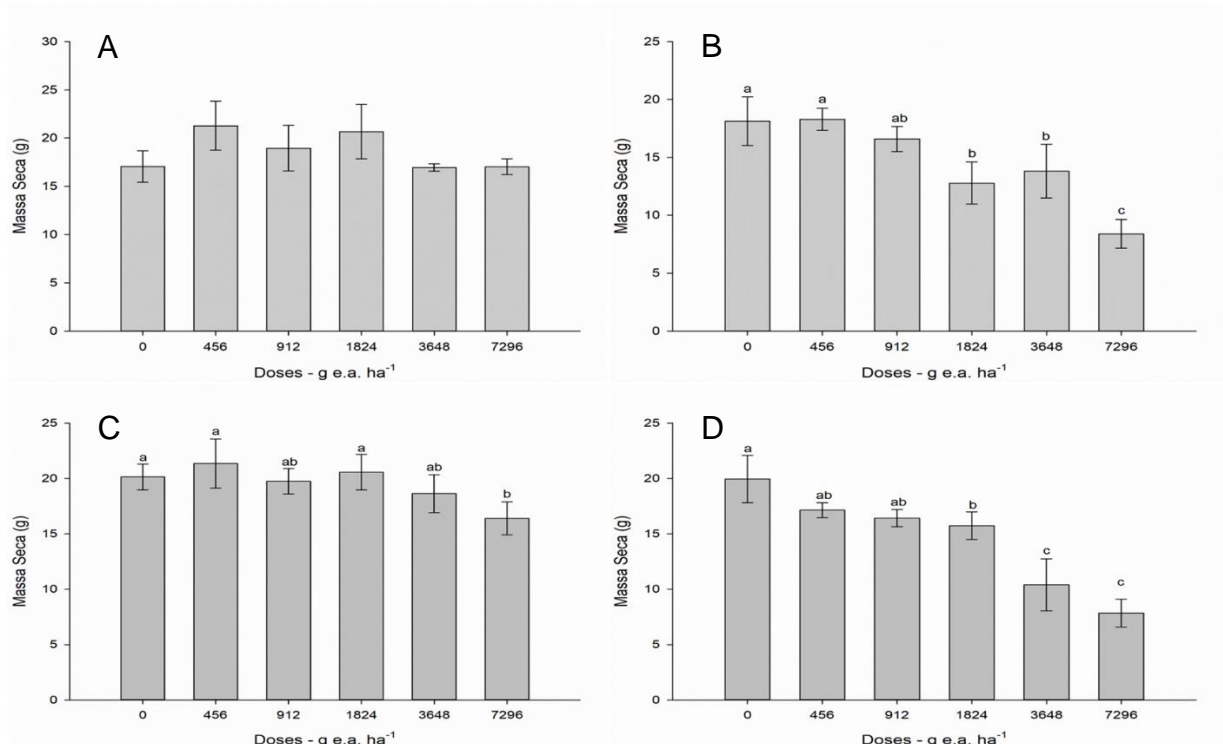
**Figura 12 - Plantas de milho com o gene *aad-1*, submetidas a doses crescentes de 2,4-D (da esquerda para direita), aos 14 DAA**



Ruen et al. (2017) não observou constantes injúrias visuais em milho com o gene *aad-1*, tratado com 2,4-D em condições de campo. Estudos de campo envolvendo o mesmo material demonstraram uma resistência do mesmo a até 3.400 g e.a ha<sup>-1</sup> por safra (WRIGHT et al., 2010).

No material sem o gene de resistência, os valores foram maiores, atingindo uma porcentagem de 60% na maior dose. Os principais sintomas ocasionados nas plantas sensíveis foram: plantas visualmente inclinadas, caules deformados e mal formação de raízes, assim como descrito por Peterson et al. (2016). Este efeito ocorreu devido ao desbalanço hormonal causado por esta molécula ao induzir à produção de etileno, que é um hormônio responsável pelo crescimento vegetal, proporcionado pela expansão lateral das células. Além disso, este hormônio também induz à senescência da planta (ABELES; MORGAN; SALTVEIT JR, 2012).

**Figura 13 - Massa Seca (em gramas) das plantas de milho, aos 28 DAA de 2,4-D, para os experimentos 3 (A e B) e 4 (C e D), no material com o gene *aad-1* (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D)**



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

A massa seca de parte aérea, representada pela Figura 13, permite distinguir o efeito ocasionado pelo herbicida nos dois materiais testados (com o gene *aad-1* e isolinha). Nas plantas resistentes, não ocorreram elevadas reduções no acúmulo de matéria seca pelos tratamentos, com exceção à dose mais elevada do experimento 4 (C), correspondendo a 19% de redução em relação à testemunha, e apresentando diferença significativa a  $p \leq 0,05$ . No experimento 3 (A), esta redução não ocorre, permanecendo os valores equivalentes à testemunha.

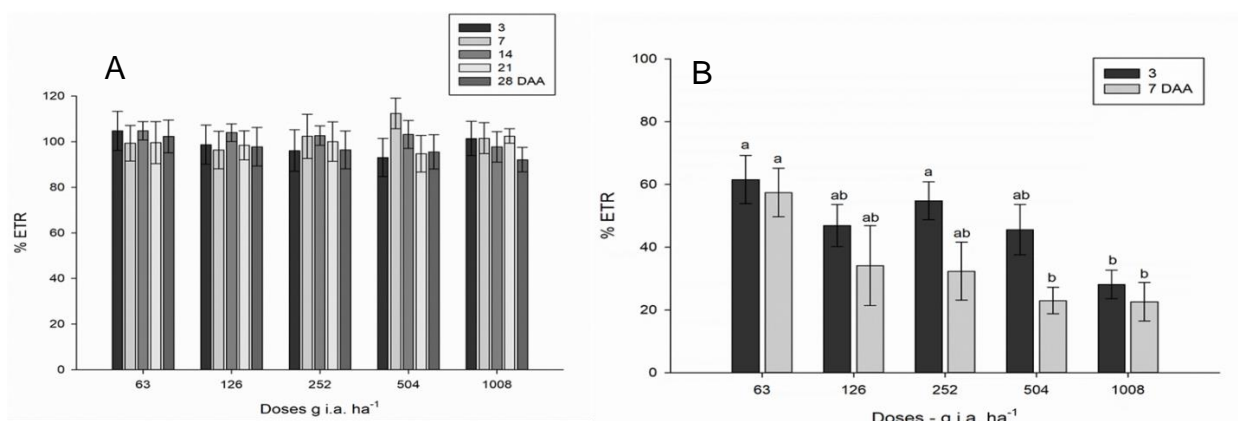
Em ambos os experimentos, é possível notar certos aumentos no teor de massa seca para as doses de 456 a 1.824 g e.a ha<sup>-1</sup>, no material com o gene de resistência (A e C). Como exemplo do experimento 3, para a dose de 1.824 g e.a ha<sup>-1</sup>, houve um incremento de 15% em relação à testemunha, e esta mesma dose, assim como as superiores, proporcionaram reduções significativas desta variável quando aplicadas à isolinha.

Portanto, de modo geral, é possível observar incrementos em diversas variáveis analisadas para o material com o gene *aad-1*, em algumas doses aplicadas. Porém, mais estudos são demandados para elucidar demais fatores relacionados a estes efeitos, e suas possíveis consequências e seu uso prático.

### 4.3 Experimentos 5 e 6: Diferentes doses de haloxyfop-methyl aplicadas sobre milho com o gene *aad-1* e sua isolinha

A Figura 14 (A) abaixo demonstra que não houve diminuições ou aumentos significativos a  $p \leq 0,05$ , da ETR para o material com o gene de resistência ao haloxyfop-methyl, mesmo em maiores doses, as quais corresponderam a até 8 vezes a dose recomendada ( $126 \text{ g i.a ha}^{-1}$ ). Araldi et al. (2012) também não encontraram diminuições na porcentagem de ETR em plantas de *Ipomoea triloba* após aplicação de  $54 \text{ g i.a ha}^{-1}$  de haloxyfop-methyl, permanecendo os valores próximos a 100%, indicando que o milho com o gene *aad-1*, assim como ocorreu com esta espécie dicotiledônea, foi resistente a este herbicida, sob doses recomendadas.

**Figura 14 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 3, 7, 14, 21 e 28 DAA de haloxyfop-methyl, referente ao experimento 5, no material com o gene *aad-1* (A) e sua isolinha sem o gene (B)**



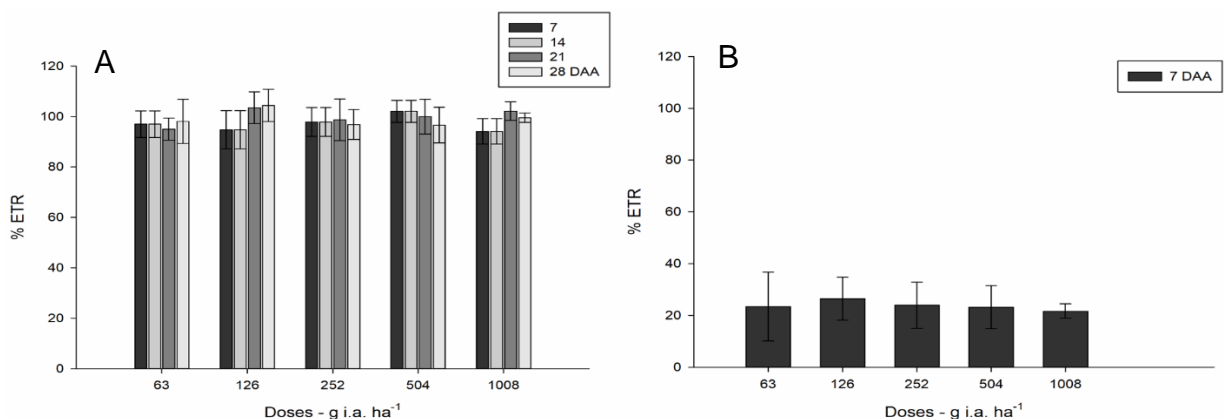
- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ). Letras iguais não diferem entre si a  $p \leq 0,05$  pelo teste de Tukey.

No entanto, existem variações entre espécies, mesmo dicotiledôneas, o que é demonstrado por Dayan e Zaccaro (2012), ao aplicarem diclofop-methyl sobre plantas de pepino, e constatarem diminuições na fluorescência de clorofila após 18 horas de escuro e 6 horas de plena luz, constatando uma maior sensibilidade em plantas desta espécie.

No gráfico B da mesma figura, que corresponde ao material sensível ao herbicida, foram observadas elevadas respostas na taxa de transporte de elétrons, já aos 3 DAA, com 40% de redução em relação a testemunha na dose de 63 g i.a ha<sup>-1</sup>. Na maior dose (1.008 g i.a ha<sup>-1</sup>), esta redução foi superior a 70%. Aos 7 DAA, estas reduções foram de 43 e 78% para a menor e maior dose, respectivamente, e as aplicações entre 63 e 126 g i.a ha<sup>-1</sup> não diferiram entre si a p≤0,05 em ambos os períodos de avaliação. No entanto, apresentaram diferenças de 15 e 23% entre si aos 3 e 7 DAA, respectivamente.

Araldi et al. (2011), ao aplicarem uma dose de 56 g i.a ha<sup>-1</sup> de haloxyfop-methyl sobre a espécie gramínea *Urochloa decumbens*, não constatarem diferenças na porcentagem de ETR em relação à testemunha em 1 DAA, porém, obtiveram uma redução de 42% aos 3 DAA, demonstrando uma lenta ação inicial deste graminicida, mas com elevado efeito de controle em poucos dias após sua aplicação.

**Figura 15 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 DAA de haloxyfop-methyl, referente ao experimento 6, no material com o gene *aad-1* (A) e sua isolinha sem o gene (B)**

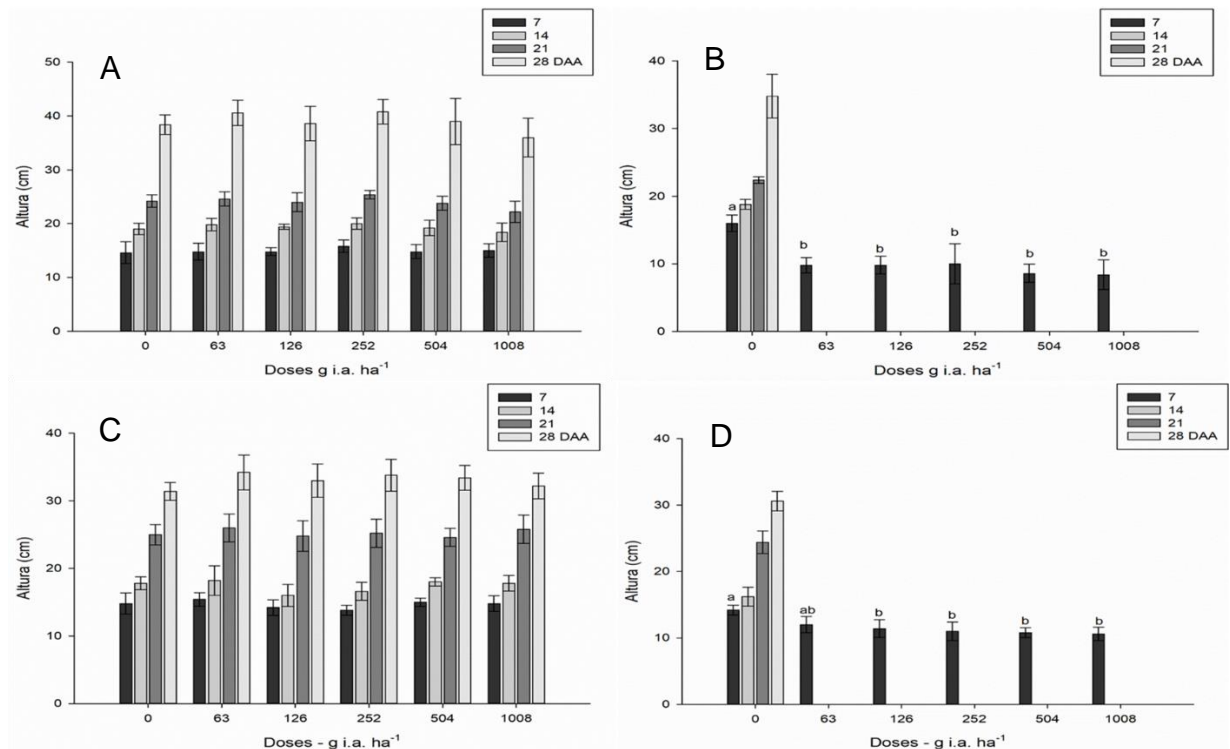


- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias (p≤0,05). Letras iguais não diferem entre si a p≤0,05 pelo teste de Tukey.

Com relação ao experimento 6, é possível notar que o comportamento da ETR para o material com o gene de resistência foi similar ao experimento anterior, ou seja, sem alterações desta variável em relação a testemunha. Quanto à isolinha, esta alteração foi elevada aos 7 DAA, com diminuições em torno de 80%. Em ambos os experimentos, não foi possível a obtenção da ETR para os períodos subsequentes, devido à morte das plantas.

A redução da porcentagem de ETR, neste caso, pode ocorrer devido à maior produção de espécies reativas de oxigênio, que causam diversas reações na planta, denominadas estresses oxidativos. Com isso, há uma interrupção da corrente de transporte de elétrons do Fotossistema II (FSII) para o Fotossistema I (FSI), ocasionando assim uma interferência na fluorescência da clorofila (KAISER; MENEGAT; GERHARDS, 2013). Portanto, mesmo que o herbicida não atue diretamente nos fotossistemas, alguns são capazes de alterar parâmetros relacionados a esta variável.

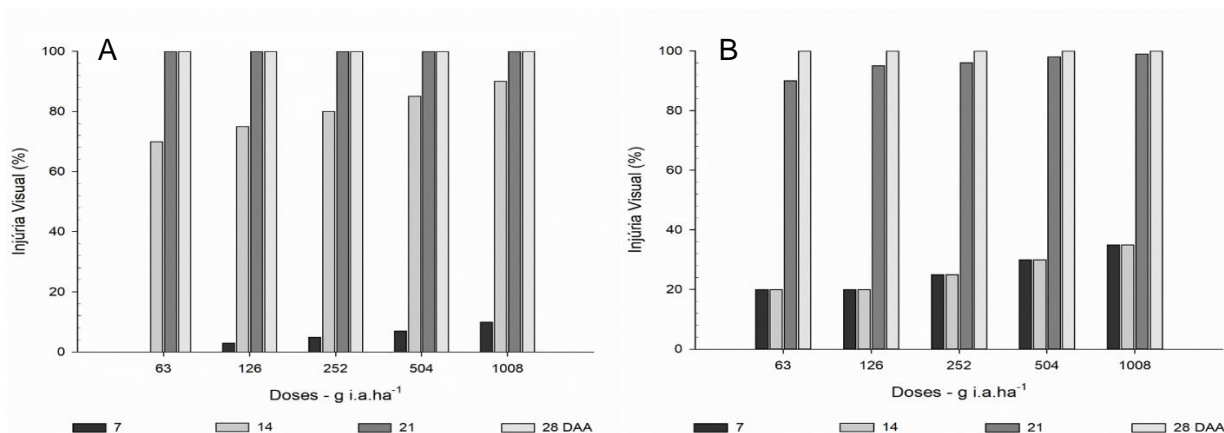
**Figura 16 - Valores absolutos de altura aos 7, 14, 21 e 28 DAA de haloxyfop-methyl, para os experimentos 5 (A e B) e 6 (C e D), no material com o gene *aad-1* (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D)**



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

A altura de plantas do material com o gene de resistência (A e C), assim como a ETR, não apresentaram alterações significativas em todos os períodos avaliados. O material sensível (B e D) demonstrou diferenças significativas de altura ( $p \leq 0,05$ ) aos 7 DAA, quando comparado a testemunha, em ambos os experimentos, podendo ser constatadas reduções de 40% para esta variável.

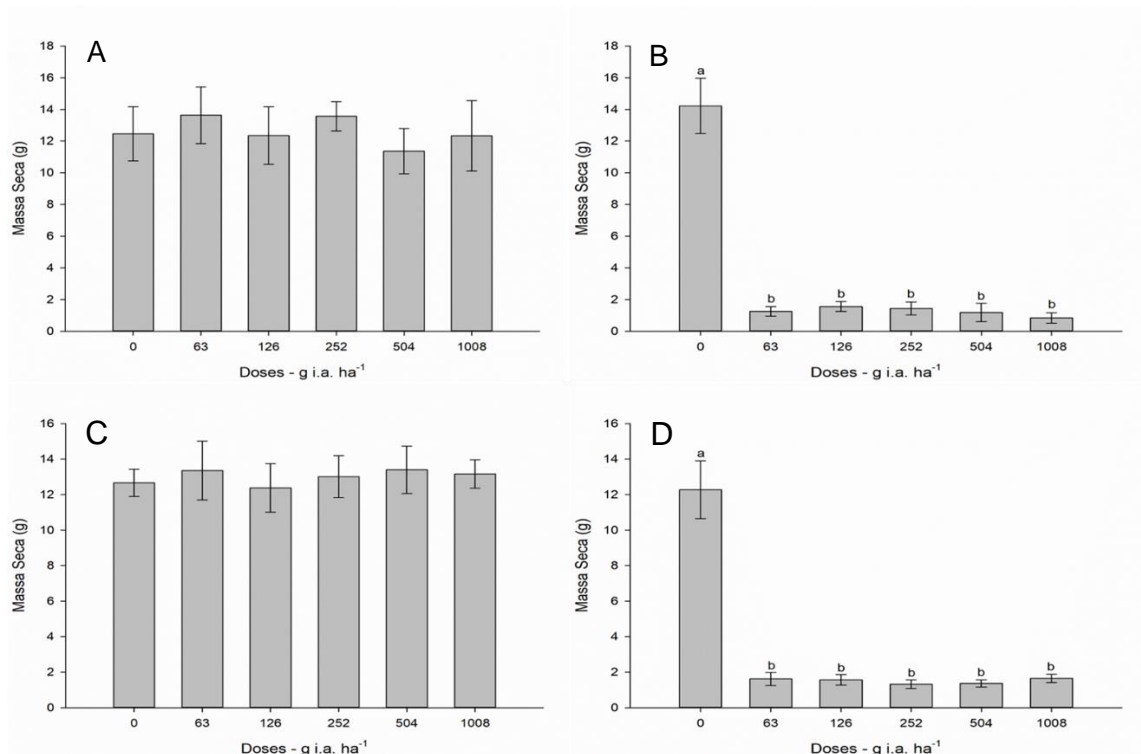
**Figura 17 - Porcentagem de injúria visual, aos 7, 14, 21 e 28 DAA de haloxyfop-methyl, para os experimentos 5 (A) e 6 (B), no material sem o gene *aad-1***



O material resistente não demonstrou sintomas visuais de injúria, e a Figura 17 mostra as porcentagens de fitointoxicação inerentes ao material sem o gene *aad-1*. De acordo com os gráficos, é possível notar que mesmo a menor dose do herbicida apresentou elevado potencial de injúria a esta gramínea, atingindo valores de 100% em ambos os ensaios, ou seja, ocasionando a morte total das plantas.

De acordo com os resultados apresentados, é válido ressaltar sobre a elevada susceptibilidade que as plantas de milho sem o gene *aad-1* apresentam, mesmo em doses abaixo daquelas recomendadas para o controle de plantas daninhas gramíneas.

**Figura 18 - Massa seca (em gramas) das plantas de milho, aos 28 DAA de haloxyfop-methyl, para os experimentos 5 (A e B) e 6 (C e D), no material com o gene *aad-1* (A e C) e sua isolinha sem o gene (B e D)**



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

Como já observado em variáveis anteriores, não foram encontradas diferenças significativas para o material resistente, o que é refletido também na massa seca final das plantas, aos 28 DAA, para ambos os experimentos (A e C). Com relação aos tratamentos aplicados sobre as plantas sensíveis, é possível notar elevado decréscimo no teor de massa seca (> 90%), mesmo na dose mais baixa, resultando na morte das plantas. A morte das plantas também pode estar relacionada à perda de estabilidade das membranas lipídicas, como a perda de ceras foliares, conforme constatado por Dayan e Watson (2011) ao aplicar diclofop-methyl sobre plantas de pepino.

### 4.3.1 Extrato Etéreo

As tabelas 5 e 6 abaixo representam as porcentagens de extrato etéreo obtidas aos 7, 14, e 28 dias após aplicação dos tratamentos, nos experimentos 5 e 6, respectivamente. Aos 28 DAA, foi possível a quantificação desta variável em apenas os tratamentos envolvendo as plantas com o gene *aad-1*.

Através do extrato etéreo, é possível se obter todo o conteúdo apolar presente na planta, e devido aos lipídeos apresentarem esta característica, sua extração através deste método se torna eficaz. O haloxyfop-methyl possui a capacidade de inibir a síntese de lipídeos, e com isso, nos tratamentos envolvendo a sua aplicação sobre as plantas sensíveis, é possível notar diminuição significativa ( $p \leq 0,05$ ) desta porcentagem já aos 7 DAA para ambos os experimentos. Este fato pode ocorrer devido à rápida paralisação de crescimento após sua aplicação, assim como a paralisação da própria síntese de lipídeos e de membranas celulares (STEPHENSON et al., 2006).

**Tabela 5 - Teores de extrato etéreo (%) referentes ao experimento 5, em milho com o gene *aad-1* e sua isolinha sem o gene, aos 7, 14 e 28 DAA, submetidos às doses 0 e 126 g i.a ha<sup>-1</sup> de haloxyfop-methyl**

Doses	7		14		28
	<i>aad-1</i>	Isolinha	<i>aad-1</i>	Isolinha	<i>aad-1</i>
<b>0</b>	4,69 ( $\pm 0,77$ ) aA	2,02 ( $\pm 0,20$ ) bA	3,90 ( $\pm 0,35$ ) aA	1,36 ( $\pm 0,37$ ) bA	3,86 ( $\pm 0,32$ )
<b>126</b>	4,08 ( $\pm 0,35$ ) aA	2,25 ( $\pm 0,27$ ) bA	3,57 ( $\pm 0,16$ ) aA	0,88 ( $\pm 0,2$ ) bB	4,52 ( $\pm 0,54$ )
<b>DMS</b>	0,69		0,43		-
<b>C.V.(%)</b>	15,97		13,37		-

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey, enquanto valores em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey

**Tabela 6 - Teores de extrato etéreo (%) referentes ao experimento 6, em milho com o gene *aad-1* e sua isolinha sem o gene, aos 7, 14 e 28 DAA, submetidos às doses 0 e 126 g i.a ha<sup>-1</sup> de haloxyfop-methyl**

Doses	7		14		28
	<i>aad-1</i>	Isolinha	<i>aad-1</i>	Isolinha	<i>aad-1</i>
<b>0</b>	2,15 (± 0,16) aB	2,30 (± 0,20) aA	2,92 (± 0,31) aA	2,17 (± 0,11) bA	2,28 (± 0,62)
<b>126</b>	3,13 (± 0,38) aA	0,89 (± 0,47) bB	3,05 (± 0,29) aA	0,19 (± 0,08) bB	2,41 (± 0,73)
<b>DMS</b>	0,5		0,33		-
<b>C.V.(%)</b>	17,68		12,0		-

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey, enquanto valores em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey

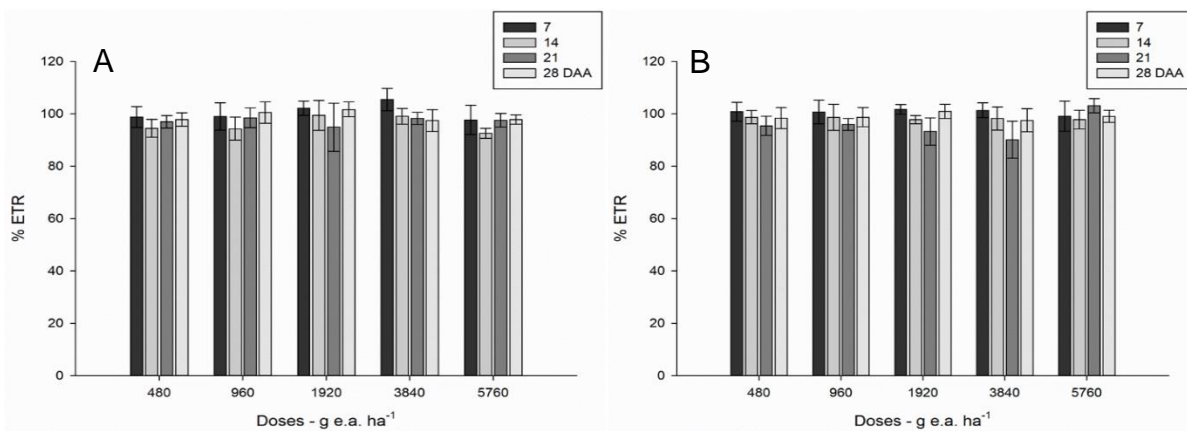
Os resultados acima corroboram com aqueles encontrados por Cataneo et al. (2013) ao aplicarem uma dose constante de 69 g i.a ha<sup>-1</sup> de fenoxaprop-p-ethyl sobre diferentes variedades de trigo, e observarem diminuições nos valores de extrato etéreo. Da mesma forma, Bianchi (2018) obteve respostas semelhantes para esta variável, após aplicação de clethodim, isolado e em associação com glyphosate, sobre dois diferentes biótipos de capim-amargoso (resistente e susceptível ao glyphosate).

De maneira geral, as porcentagens de extrato etéreo não foram alteradas nos tratamentos envolvendo as plantas contendo o gene *aad-1*, em comparação com a testemunha. Assim, é possível inferir que o herbicida não alterou a produção de lipídeos nas plantas resistentes.

#### **4.4 Experimento 7: Doses de glyphosate aplicadas sobre milho com o gene *aad-1* e sua isolinha**

O referido ensaio foi realizado para testar se a inserção do gene *aad-1* poderia ocasionar algum efeito sobre as plantas de milho, ou seja, aumentando ou diminuindo sua resistência a aplicação de glyphosate.

**Figura 19 - Taxa de transporte de elétrons (ETR - % em relação à testemunha) aos 7, 14, 21 e 28 DAA de glyphosate, referente ao experimento 7, no material com o gene *aad-1* (A) e sua isolinha sem o gene (B)**

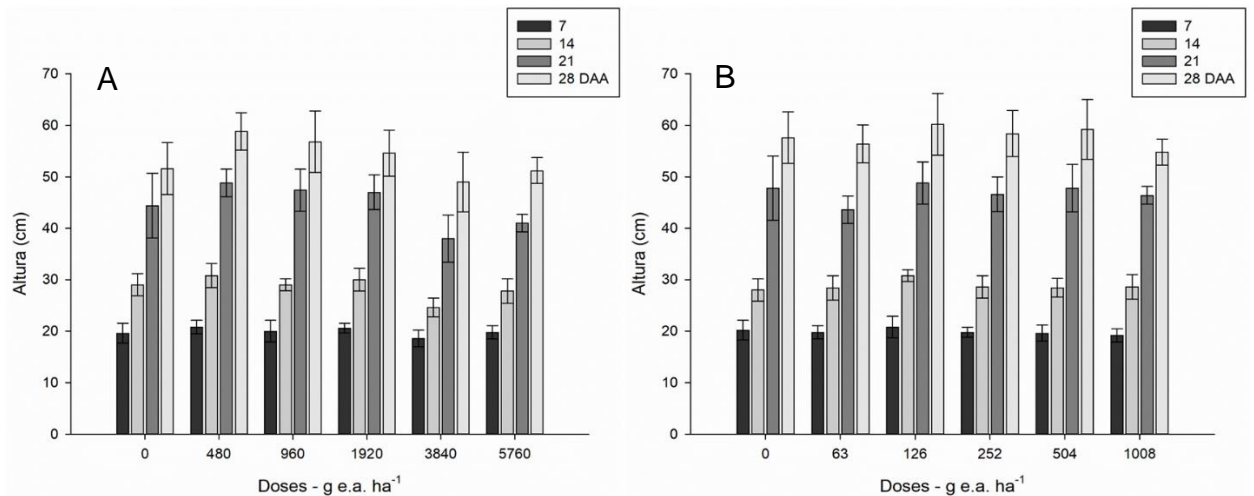


- Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ).

A Figura 19 acima demonstra que os valores de ETR permaneceram próximos a 100% em todos os tratamentos, nos dois materiais testados. As médias não diferiram entre si pelo teste de Tukey a  $p \leq 0,05$ . A isolinha, neste caso, se manteve com valores próximos a testemunha também, devido ao fato de ambos apresentarem o gene *cp4 epsps*. Dayan e Zaccaro (2012) não observaram alterações na fluorescência de clorofila de plantas de pepino submetidas à aplicação de glyphosate, após diferentes períodos de luz e de escuro. Olesen e Cedergreen (2010) concluíram que a fluorescência de clorofila não foi afetada em plantas de cevada, submetidas a aplicação de diferentes doses de glyphosate.

Krenchinski et al. (2017) demonstraram que quatro variedades de soja resistentes ao glyphosate, ao receberem duas doses crescentes desta molécula (720 e 2.160 g e.a ha<sup>-1</sup>), de modo geral, não apresentaram seus índices de clorofila comprometidos, os quais foram mensurados através de índice SPAD.

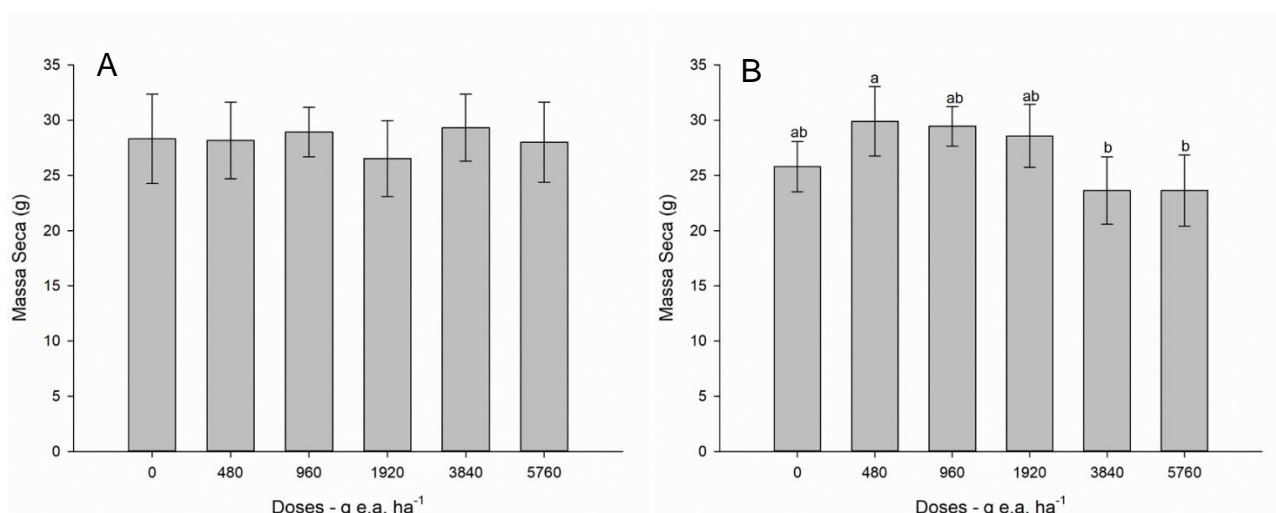
**Figura 20 - Valores absolutos de altura aos 7, 14, 21 e 28 DAA de glyphosate, para o experimento 7, no material com o gene *aad-1* (A) e sua isolinha sem o gene (B)**



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

A altura de plantas também não foi alterada de forma significativa a  $p \leq 0,05$  para todos os períodos avaliados, em ambos os materiais. No entanto, é possível notar certa diminuição de altura no material com o gene *aad-1*, nas maiores doses, aos 21 DAA. Fato similar foi observado por Krenchinski et al. (2013), ao aplicar doses mais elevadas (2.160 e 2.880 g e.a ha<sup>-1</sup>) de glyphosate sobre milho RR, também aos 21 DAA. No entanto, o mesmo autor não constatou diminuições na altura final das plantas, ou seja, em seu ponto de maturidade fisiológica.

**Figura 21 - Massa Seca (em gramas) dos tratamentos aos 28 DAA de glyphosate, para o experimento 7, no material com o gene *aad-1* (A) e sua isolinha sem o gene (B)**



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

A massa seca das plantas não foi alterada no material com o gene *aad-1*, permanecendo assim mais estável sob as diferentes doses de glyphosate aplicadas. No material sem este gene, não houve reduções significativas a  $p \leq 0,05$  desta variável, em comparação com a testemunha. Porém, é possível observar alguns incrementos em três doses (480, 960, e 1.920 g e.a ha<sup>-1</sup>), mas que não apresentam diferença significativa em relação à testemunha. A dose de 480 g e.a ha<sup>-1</sup> apresentou maior teor de massa seca em relação às doses mais elevadas (3.840 e 5.760).

Assim, é possível demonstrar ambos os materiais não foram influenciados pela aplicação de glyphosate, e que o gene *aad-1* não exerceu nenhuma influência sobre a resistência da cultura a este herbicida.

## 5 CONCLUSÕES

A aplicação das misturas dos herbicidas em doses recomendadas não reduziu as variáveis de ETR, altura, massa seca, e componentes de produção, como a produtividade.

As aplicações de doses isoladas de 2,4-D e haloxyfop-methyl não prejudicaram o desenvolvimento das plantas com o gene *aad-1*, no entanto, reduziram a ETR, altura e massa seca inerentes a isolinha. Quanto ao glyphosate, não foram observados danos significativos em ambos os materiais.

A tecnologia EnList™ é segura quanto ao uso sob doses recomendadas de 2,4-D e haloxyfop-methyl em milho contendo o gene *aad-1*, porém mais estudos de campo são necessários para elucidar os efeitos dessas moléculas aplicadas em associação com outros herbicidas.



## REFERÊNCIAS

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT JR, M. E. **Ethylene in plant biology**. 2. ed. Academic Press, 2012.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 30. mai. 2019.
- ALBRECHT, A. J. P. et al. O milho RR2 e o glyphosate: Uma revisão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 13, n. 1, p. 58-67, 2014.
- ALTIERI, M. A. et al. Enhancing crop productivity via weed suppression in organic no-till cropping systems in Santa Catarina, Brazil. **Journal of Sustainable Agriculture**, v. 35, n. 8, p. 855-869, 2011.
- ALVARENGA, R. C. et al. Plantas de cobertura de solo para sistema plantio direto. Informe Agropecuário. **Embrapa Milho e Sorgo**, v. 22, n. 208, p. 25-36, 2001.
- ALVES, H.C.R.; AMARAL, R.F. do. Produção, área colhida e produtividade do milho no Nordeste. **Fortaleza: Banco do Nordeste**, n. 16, 2011. Disponível em: [https://bnb.gov.br/documents/88765/89729/ire\\_ano5\\_n16.pdf/bea61fe8-4c6d-4f02-ade4-21dcfd901fdf](https://bnb.gov.br/documents/88765/89729/ire_ano5_n16.pdf/bea61fe8-4c6d-4f02-ade4-21dcfd901fdf). Acesso em: 22 mai. 2019.
- ANDERSON, W. P. **Weed science principles**. New York: West Publishing, 1983.
- ARALDI, R. et al. Análises de fluorescência e consumo de água em *Brachiaria decumbens* após aplicação de herbicidas em pós-emergência. **Planta Daninha**, v. 29, n. especial, p. 1053-1060, 2011.
- ARALDI, R. et al. Eficiência fotossintética e consumo de água de *Ipomoea triloba* após aplicação de herbicidas. **Planta Daninha**, v. 30, n. 3, p. 517-524, 2012.
- ARTUZI, J. P.; CONTIERO, R. L. Herbicidas aplicados na soja e produtividade do milho em sucessão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1119-1123, 2006.
- ARTUZO, F. D et al. O Potencial Produtivo Brasileiro: Uma Análise Histórica da Produção de Milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 515-540, 2019.
- AZEVEDO, M. G. et al. Sistemas integrados lavoura-pecuária (ILP) e lavoura-pecuária-floresta (ILPF) no sudoeste amazônico: produção e desempenho econômico. In: IX ENCONTRO DE INICIAÇÃO À PESQUISA DA EMBRAPA RONDÔNIA, 9. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 4., 2018, Porto Velho. **Embrapa Rondônia-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2018. p. 21.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, n. 1, p. 89-113, 2008.

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 JÚNIOR, A. A.; ALVADI A; FLECK, N. G. Competitividade de dois genótipos de milho (*Zea mays*) com plantas daninhas sob diferentes espaçamentos entre fileiras. **Planta Daninha**. vol. 23, n. 3, p. 415-421, 2005.

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.

BERGAMASCHI, H; MATZENAUER, R. **O Milho e o Clima**. Porto Alegre, RS: Ascar, 2014

BERIAULT, J. N.; HORSMAN, G. P; DEVINE, M. D. Phloem transport of D, L-glufosinato de amônio and acetyl-L-glufosinato de amônio in glufosinato de amônio-resistant and-susceptible *Brassica napus*. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 619-628, 1999.

BEVILAQUA, N. da C. **Dinâmica e ação do nicosulfuron em híbridos de milho**. 2019. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2019.

BIANCHI, L. **Efeito de glyphosate e clethodim isolados e em mistura em *Digitaria insularis***. 2018. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2018.

CAJACOB, C. A. et al. Genetically modified herbicide resistant crops. *In*: KRÄMER, W.; SCHIRMER, W. **Modern Crop Protection Compounds**. Weinheim: Wiley-Vch, 2007, p. 283-316.

CARVALHO, S. J. P. de et al. Herbicide selectivity by differential metabolism: considerations for reducing crop damages. **Scientia Agrícola**, v. 66, n. 1, p. 136-142, 2009.

CATANEO, A. C. et al. Mefenpyr-diethyl action on fenoxaprop-p-ethyl detoxification in wheat varieties. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 387-393, 2013.

CAVALIERI, S. D. et al. Tolerância de híbridos de milho ao herbicida nicosulfuron. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 203-214, 2008.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA). 2019. Indicador do Milho Esalq/BM&FBovespa. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/milho.aspx>. Acesso em: 26 mai. 2019.

CHAHAL, P. S. et al. Growth stage affects dose response of selected glyphosate-resistant weeds to premix of 2, 4-D choline and glyphosate (Enlist Duo™ herbicide\*). **Journal of Agricultural Science**, v. 7, n. 11, p. 1, 2015.

CHIKOYE, D.; UDENSI, U. E. LUM, A. F. Evaluation of a new formulation of atrazine and metolachlor mixture for weed control in maize in Nigeria. **Crop Protection**, v. 24, n. 11, p. 1016-1020, 2005.

CIB. Conselho de Informações Sobre Biotecnologia. **Produtos Transgênicos Aprovados**. 2018. Disponível em: <https://cib.org.br/produtos-aprovados/>. Acesso em: 01 jul. 2019.

COETZER, E.; AL-KHATIB, K. Photosynthetic inhibition and ammonium accumulation in Palmer amaranth after glufosinato de amônio application. **Weed Science**, v. 49, n. 4, p. 454-459, 2001.

COLE, D. J. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. **Pesticide Science**, v.42, p.209-222, 1994.

CONAB. Análise das culturas. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: safra 2018/19: oitavo levantamento**, Brasília, DF, v. 6, n. 8, p. 74-79, mai. 2019.

CORRÊA, J. C. et al. Efeito do intervalo de dessecação antecedendo a semeadura do milho e do uso de diferentes espécies de plantas de cobertura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 2, p. 739-746, 2008.

CRUZ, J. C. et al. **Cultivo do Milho**. 6. Ed. Embrapa Milho e Sorgo, 2010.

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

CUNHA, A. R da.; MARTINS, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. Irriga, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 1-11, jan-mar, 2009.

DAN, H. A. et al. Resíduos de herbicidas utilizados na cultura da soja sobre o milho cultivado em sucessão. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 86-91, 2012.

DAYAN, F. E.; WATSON, S. B. Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 3, p. 182-190, 2011.

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

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.

DEVINE, M.; DUKE, S.O.; FEDTKE, C. **Physiology of Herbicide Action**. Englewood Cliffs: PTR Prentice Hall, 1992.

DILL, G. M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 61, n. 3, p. 219-224, 2005.

DOGAN, M. et al. Determination of optimum weed control timing in maize (*Zea mays* L.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 28, n. 5, p. 349-354, 2004.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. Milho: Equações gerais para manejo da cultura de milho. *In*: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Tecnologia da produção de milho**. Piracicaba: Publique, 1997. p. 171-174.

Dow AgroSciences. Guia de sementes 2016. Disponível em: [http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh\\_0965/0901b803809657ef.pdf?filepath=br/pdfs/noreg/013-05181.pdf&fromPage=GetDoc](http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_0965/0901b803809657ef.pdf?filepath=br/pdfs/noreg/013-05181.pdf&fromPage=GetDoc) Acesso em: 21 maio. 2019.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. Milho: ecofisiologia e rendimento. *In*: FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. **Tecnologia da produção de milho**. Piracicaba: Publique, 1997. p. 157-170.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e fenologia. *In*: Fancelli, AL; Dourado Neto, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000, p. 21-54.

FANCELLI, A. L. Ecofisiologia, Fenologia e Implicações Básicas de Manejo. *In*: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. **Milho: Do Plantio à Colheita**. Viçosa: UFV, 2015. cap. 3, p. 50-76.

FIESP. Safra Mundial de Milho 2019/2020 - 1º Levantamento do USDA. Disponível em: [file:///C:/Users/bfgio/Downloads/file-20190516191800-boletimilhomaio2019%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/bfgio/Downloads/file-20190516191800-boletimilhomaio2019%20(1).pdf). Acesso em: 10 jul. 2019.

FIORINI, I. V. A et al. Produtividade e seus componentes segundo épocas de semeadura do milho safrinha no Norte de Mato Grosso. v. 5, n. 2, p. 54-65, 2018.

FOLONI, L. L. Impacto ambiental do uso de herbicidas. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 22, 2000, Foz-do-Iguaçu. **Palestras [...]**. Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2000. p. 49-91.

FRANZ, J. E. MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. et al. Glyphosate: a unique global herbicide. **American Chemical Society**, 1997, 678 p.

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.

GIOVANELLI, B. F. et al. Selectivity of Herbicides Applied Separately or in Combination in the Post Emergence of RR2 Maize. **Brazilian Journal of Agriculture - Revista de Agricultura**, v. 93, n. 1, p. 47-57, 2018.

GONÇALVES, F. A. R. et al. Atividade residual de herbicidas nas culturas do milho e da soja. **Revista de Ciências Agrárias - Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 61, 2018.

GROSSMAN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 113-120, 2010.

HALL, M. R.; SWANTON, C. J.; ANDERSON, G. W. The critical period of weed control in grain corn (*Zea mays*). **Weed Science**, v. 40, n. 3, p. 441-447, 1992.

HAN, H. et al. Enhanced herbicide metabolism induced by 2,4-D in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl. **Pest Management Science**, v. 69, n. 9, p. 996-1000, 2013.

HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <http://www.weedscience.org/Summary/Country.aspx>. Acesso em: 04 junho 2019.

HERTWIG, K. V. Manual de herbicidas desfolhantes, dessecantes e fitoreguladores. São Paulo: Ceres, 1977.

IMEA. Custo de Produção do Milho – Safra 2018/19, Março de 2018. Disponível em: <http://www.imea.com.br/upload/publicacoes/arquivos/24042018195433.pdf>. Acesso em: 26 maio 2019.

ISAAA. GM Approval Database. **International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications**. Disponível em: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>. Acesso em: 04 junho 2019.

JUNEAU, P.; QIU, B.; DEBLOIS, C. P. Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 609-625, 2007.

KAISER, Y. I.; MENEGAT, A.; GERHARDS, R. Chlorophyll fluorescence imaging: a new method for rapid detection of herbicide resistance in *Alopecurus myosuroides*. **Weed Research**, v. 53, n. 6, p. 399-406, 2013.

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.

KARAM, D. et al. Situação atual da resistência de plantas daninhas a herbicidas nos sistemas agrícolas. In: PAES, M. C. D.; PINHO, R. G. V.; MOREIRA, S. G. **Livro de Palestras. XXXII Congresso Nacional de Milho e Sorgo “Soluções integradas**

**para os sistemas de produção de milho e sorgo no Brasil**". Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas: ABMS, 2018. p. 902-932.

KNEZEVIC, S. Z. et al. Critical period for weed control: the concept and data analysis. **Weed Science**, v. 50, n. 6, p. 773-786, 2002.

KNEZEVIC, S. Z.; EVANS, S. P.; MAINZ, M. Row spacing influences the critical timing for weed removal in soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, v. 17, n. 4, p. 666-673, 2003.

KOZLOWSKI, L. A. Critical period of weed interference in corn crop based on crop phenology. **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 365-372, 2002.

KRENCHINSKI, F. H. et al. Efeito do glyphosate na altura do milho RR2 cultivado na safrinha. *In*: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 12, 2013, Dourados. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2013.

KRENCHINSKI, F. H. et al. Glyphosate affects chlorophyll, photosynthesis and water use of four Intacta RR2 soybean cultivars. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 2, p. 63, 2017.

KRENCHINSKI, F. H. et al. Post-emergent applications of isolated and combined herbicides on corn culture with cp4-epsps and pat genes. **Crop Protection**, v. 106, p. 156-162, 2018.

LEITE, R. C de C; LEAL, M. R. L. V. O Biocombustível no Brasil. **CEBRAP**, São Paulo, n. 78, p. 15-21, julh 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-33002007000200003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-33002007000200003&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 22 maio 2019.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F. et al. Culturas Geneticamente Modificadas Tolerantes a Herbicidas. *In*: MONQUERO, P. A. **Aspectos da Biologia e Manejo das Plantas Daninhas**. São Carlos: RiMa Editora, 2014. cap. 12, p. 285-305.

MACIEL, C. D. de G. et al. Eficácia do herbicida Haloxypop R (GR-142) isolado e associado ao 2, 4-D no controle de híbridos de milho RR<sup>®</sup> voluntário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 2, p. 112-123, 2013.

MAGALHÃES, P. C et al. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 23 p. (Circular Técnica, 22).

MARCHESI, B. B. **Efeitos de formulações e intervalos sem chuva na absorção, translocação e eficácia de glyphosate e 2,4-D**. 2016. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016.

MARINHO, A. F. Etanol de milho avança no Brasil. **Canal. Jornal da Bioenergia**. Disponível em: <http://www.canalbioenergia.com.br/etanol-de-milho-e-de-cana-na-producao-de-combustivel/>. Acesso em: 25. Mai. 2019.

MELANDER, B.; RASMUSSEN, I. A.; BÀRBERI, P. Integrating physical and cultural methods of weed control—examples from European research. **Weed Science**, v. 53, n. 3, p. 369-381, 2005.

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.

MOHANTY, P. G. The slow decline and the subsequent rise of chlorophyll fluorescence transients in intact algal cells. **The Plant Biochemical Journal**, v. 1, n. 2, p. 78-106, 1974.

NEVES, R.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Intervalo de tempo para semeadura de milho pós-dessecação da cobertura de aveia-preta com herbicidas. **Ciencia Rural**, v. 29, n. 4, p. 603-608, 1999.

NASTARI, P. M. Etanol de milho tem futuro no Brasil. **AgroANALYSIS**, v. 38, n. 4, p. 26-27, 2019.

OLESEN, C. F.; CEDERGREEN, N. Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 66, n. 5, p. 536-542, 2010.

OLIVEIRA JR, R. S. Introdução ao controle químico. *In*: DE OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. Cap. 6, p. 125-140

OLIVEIRA JR, R. S.; INOUE, M. H. Seletividade de herbicidas para culturas e plantas daninhas. *In*: DE OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. Cap. 10, p. 243-263

OLIVEIRA, C. et al. População de caruru (*Amaranthus hybridus*) resistente ao glyphosate são encontradas no Rio Grande do Sul. *In*: ALBRECHT, A. J. P. et al. **Boletim Informativo**. Londrina: SBCPD, 2019, v. 28, n. 1, p. 24-25.

PATERNIANI, E. Importância do milho na agroindústria. *In*: OSUNA, J.A.; MORO, J.R. **Produção e Melhoramento de milho**. Jaboticabal: Funep, 1995. P. 1-11.

PAWELKIEWICZ, R. **Interação aditiva, sinérgica ou antagônica de herbicidas aplicados na cultura do milho**. 2018. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2018.

PETERSON, M. A. et al. 2,4-D past, present, and future: a review. **Weed Technology**, v. 30, n. 2, p. 303-345, 2016.

PIMENTEL, D.; PATZEK, T. W. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; Biodiesel production using soybean and sunflower. **Natural Resources Research**, v. 14, n. 1, p. 65-79, 2005.

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. **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. São Carlos: RiMa Editora, 2014. p. 61–82

PLEASANT, J. M.; BURT, R. F.; FRISCH, J. C. Integrating mechanical and chemical weed management in corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, v. 8, n. 2, p. 217-223, 1994.

PLINE, W. A.; WU, J.; HATZIOS, K. K. Absorption, translocation, and metabolism of glufosinato de amônio in five weed species as influenced by ammonium sulfate and pelargonic acid. **Weed Science**, v. 47, n. 6, p. 636-643, 1999.

PRINS, U.; WIT, J. de. Intercropping cereals and grain legumes: a farmer's perspective. *In*: JOINT ORGANIC CONGRESS, 2006, Odense. **Abstracts...** Odense: Dansk Landbrugsrådgivning, 2006. p. 292-293.

REIS, T. C. et al. Efeitos de fitotoxicidade do herbicida 2, 4-D no milho em aplicações pré e pós-emergência. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 10, n. 1, 2010.

RIZZARDI, M. A. et al. Manejo de plantas daninhas na cultura do milho. *In*: MONQUERO, P. A. **Manejo de plantas daninhas nas culturas agrícolas**. São Carlos: RiMa Editora, 2014. p. 41–52.

ROMAN, E. D. et al. **Como funcionam os herbicidas**: da biologia à aplicação. Passo Fundo: BERTHIER, 2007, p. 59-67.

RUEN, D. C. et al. Tolerance of corn with glyphosate resistance and the aryloxyalkanoate dioxygenase trait (AAD-1) to 2,4-D choline and glyphosate. **Weed Technology**, v. 31, n. 2, p. 217-224, 2017.

SASAKI, Y.; NAGANO, Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 6, p. 1175-1184, 2004.

SIDHU, R. S. et al. Glyphosate-tolerant corn: The composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant corn is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2305-2312, 2000.

SILVA, D. J. Determinação da gordura bruta ou extrato etéreo. *In*: SILVA, D. J. (Ed.). **Análise de alimentos**; métodos químicos e biológicos. 2.ed. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, UFV, 1990. p. 12-14.

SILVA, A. A. DA et al. Manejo de plantas daninhas. *In*: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. **Milho: do plantio a colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015. p. 242–272.

SILVA, A. F. M. et al. Seletividade de herbicidas isolados e em associações para milho RR2/LL<sup>®</sup>. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 16, n. 1, p. 60-66, 2017.

SIMINSZKY, B. Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2-3, p. 445-458, 2006.

SKELTON, J. J. et al. Comparative analysis of 2,4-D uptake, translocation, and metabolism in non-AAD-1 transformed and 2,4-D-resistant corn. **Weed Science**, v. 65, n. 5, p. 567-578, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS (SBCPD). Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas. Londrina: SBCPD, 1995.

SOLTANI, N. et al. The effect of residual corn herbicides on injury and yield of soybean seeded in the same season. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, n. 3, p. 571-576, 2011.

SOLTANI, N.; SHROPSHIRE, C.; SIKKEMA, P. H. Control of volunteer corn with the AAD-1 (aryloxyalkanoate dioxygenase-1) transgene in soybean. **Weed Technology**, v. 29, n. 3, p. 374-379, 2015.

STEPHENSON, G. R. et al. Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 11, p. 2075-2154, 2006.

SWANTON, C. J.; WEISE, S. F. Integrated weed management: the rationale and approach. **Weed Technology**, v. 5, n. 3, p. 657-663, 1991.

TEASDALE, J. R.; BESTE, C. E.; POTTS, W. E. Response of weeds to tillage and cover crop residue. **Weed Science**, v. 39, n. 2, p. 195-199, 1991.

TURSUN, N. et al. The critical period for weed control in three corn (*Zea mays* L.) types. **Crop Protection**, v. 90, p. 59-65, 2016.

USDA. Agricultural Statistics 2018. Washington, DC: Government Printing Office, 2018. Disponível em: [https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag\\_Statistics/2018/Chapter01.pdf](https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2018/Chapter01.pdf) . Acesso em 25 mai. 2019.

VAN EERD, L. L. et al. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, v. 51, n. 4, p. 472-495, 2003.

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](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do61.pdf). Acesso em: 28 maio 2019.

VELINI, E. D.; DUKE, S. O.; TRINDADE, M. L. B. MESCHEDE, D. K.; CARBONARI, C. A. Modo de ação do glyphosate. In: VELINI, E. D.; MESCHEDE, D. K.;

CARBONARI, C. A.; TRINDADE, M. L. B. **Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, 2009. cap. 5, p. 113-134.

WEAVER, S. E.; TAN, C. S. Critical period of weed interference in transplanted tomatoes (*Lycopersicon esculentum*): growth analysis. **Weed Science**, v. 31, n. 4, p. 476-481, 1983.

WESTWOOD, J. H. et al. Weed management in 2050: Perspectives on the future of weed science. **Weed Science**, v. 66, n. 3, p. 275-285, 2018.

WRIGHT, T. R. et al. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 47, p. 20240-20245, 2010.

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

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.