

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**INTOXICAÇÃO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS DO ALGODÃO  
SENSÍVEL E RESISTENTE AO AMÔNIO GLUFOSINATE**

**DÉBORA DE OLIVEIRA LATORRE**

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

BOTUCATU – SP

Julho – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**INTOXICAÇÃO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS DO ALGODÃO  
SENSÍVEL E RESISTENTE AO AMÔNIO GLUFOSINATE**

**DÉBORA DE OLIVEIRA LATORRE**

Orientador: Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Luis Cavenaghi

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

BOTUCATU – SP

Julho – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R358i Latorre, Débora de Oliveira, 1986-  
Intoxicação e alterações metabólicas do algodão sensível e resistente ao amônio glufosinate / Débora de Oliveira Latorre. - Botucatu : [s.n.], 2014  
xi, 65 f. : fots. color., ils. color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2014  
Orientador: Caio Antonio Carbonari  
Coorientador: Anderson Luis Cavenaghi  
Inclui bibliografia

1. Amônia. 2. Glutamato. 3. Herbicidas. 4. Toxicidade.  
I. Carbonari, Caio Antonio. II. Cavenaghi, Anderson Luis.  
III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "INTOXICAÇÃO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS DO ALGODÃO  
SENSÍVEL E RESISTENTE AO AMÔNIO GLUFOSINATE"

ALUNA: DÉBORA DE OLIVEIRA LATORRE

ORIENTADOR: PROF. DR. CAIO ANTONIO CARBONARI

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:



PROF. DR. CAIO ANTONIO CARBONARI



PROF. DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI



PROFª DRª ELZA ALVES CORREA

Data da Realização: 07 de julho de 2014.

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.  
Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente,  
antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”*

***Charles Chaplin***

*Aos meus pais Izolda Maria de Oliveira Latorre e Vicente Latorre Filho  
e a minha irmã Gabriela de Oliveira Latorre  
pelo amor, carinho, companheirismo, incentivo, apoio,  
paciência, confiança, participação e dedicação.*

***Dedico***

## ***AGRADECIMENTOS***

- A Deus, por estar sempre presente comigo neste árduo período de elaboração, condução e conclusão do trabalho, permitindo a realização desta importante etapa de minha vida;
- Ao meu Orientador Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari, pelo apoio, incentivo, participação, conselhos e por sempre estar presente em todas as atividades realizadas e momentos decisivos;
- Aos meus amigos e companheiros de mestrado e doutorado do Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia - NUPAM, que permaneceram ao meu lado e me auxiliaram em todos os momentos: Ilca Puertas de Freitas e Silva, Bruna Barboza Marchesi, Ivana Paula Ferraz Santos de Brito, Gilmar José Picoli Junior, Ana Karollyna Alves de Matos, Diego Belapart, Plínio Saulo Simões, Giovanna Larissa Gimenes Cotrick Gomes, Leandro Tropaldi, Renan Fonseca Nascentes, Gabrielle de Castro Macedo, Rosilaine Araldi, Marcelo Giroto, Natália Corniani, Maria Rosicler, Edicarlos Batista de Castro.
- Aos técnicos de campo e laboratório do NUPAM: Luis Marcelo Siono, José Guilherme Cordeiro e José Roberto Marques Silva, não somente pelo auxílio das atividades realizadas na condução do experimento e nas análises laboratoriais, mas por sempre sanarem as minhas dúvidas, participarem de discussões construtivas, estarem sempre dispostos a ajudar, sempre estarem de bom humor e dispostos a me deixar de bom humor também.
- Ao Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini pelas preciosas contribuições e ensinamentos do trabalho;
- Ao Prof. Dr. Anderson Luis Cavenaghi pelo apoio e incentivo inicial e ao longo do desenvolvimento dos experimentos;
- Aos meus amigos Ana Paula Schimidt Russo, Fernando Ferrari Putti, Josué Ferreira Silva Junior, Aline Sandim, Natália Rodrigues Ferreira, Gabriela Zucari de Andrade, Jesaelen Gizotti de Moraes, Thaís Botamede, Ana Cláudia Macedo pela paciência, companheirismo, carinho e por sempre estarem presentes em minha vida;
- Aos queridos professores do programa de pós graduação da Faculdade de Ciências Agrônomicas UNESP Botucatu/SP, especialmente aos professores do Departamento de

Produção e Melhoramento Vegetal, pelo ensinamento, dedicação e experiências compartilhadas ao longo destes 24 meses;

- Aos meus familiares, pela compreensão amor, carinho que me proporcionam uma base forte para passar por todos os momentos de dificuldade;
- A CAPES, pela bolsa concedida;
- Ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP Botucatu/SP, por sempre estarem prontos a auxiliar e solucionar os problemas;
- Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP Botucatu/SP, por sempre serem tão carinhosos e prestativos;
- A todos os demais funcionários da Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP Botucatu/SP, que diretamente ou indiretamente contribuíram na realização da minha dissertação;
- Aos meus amigos de infância Adriana de Sousa Andrade, Bruno dos Santos Silva, Lyvia Cristina Camaroto Batiston Rodrigues Sato, Henrique Sato, Larissa Cândido Alves, Renato Ghetti Tanan, que mesmo apesar da distância sempre estão presentes em minha vida;
- A Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP Botucatu/SP, por me proporcionar uma base de conhecimento da graduação à pós graduação.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
1 RESUMO.....	1
2 SUMMARY.....	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
4.1 Cultura do Algodão.....	8
4.2 Rota de Incorporação do Nitrogênio nas Plantas.....	11
4.3 Amônio Glufosinate.....	13
4.3.1 Características Físico-Químicas e Processos de Degradação.....	14
4.3.2 Modo de Ação.....	18
4.4 Tecnologia Liberty Link <sup>®</sup> e WideStrike <sup>®</sup> .....	20
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1 Condução do Experimento.....	23
5.2 Extração e Quantificação de Amônia .....	26
5.3 Extração e Determinação do Glufosinate, Glutamato e Serina.....	28
5.4 Avaliações de Fluxo de Transporte de Elétrons e Fitotoxicidade.....	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6.1 Fitotoxicidade .....	34
6.2 Taxa de Transporte de Elétrons .....	36
6.3 Teor de Amônia.....	38
6.4 Teor dos compostos do metabolismo do herbicida amônio glufosinate em plantas de algodão.....	41
6.4.1 Glutamato.....	41
6.4.2 Glufosinate.....	43
6.4.3 Serina .....	45
8 CONCLUSÕES.....	49
9 ANEXO .....	50
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA .....	56

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Tratamentos experimentais. Botucatu/SP, 2014.....	25
Tabela 2. Massa molecular e íons secundários dos compostos analisados. Botucatu/SP, 2014. ....	30
Tabela 3. Curvas analíticas e faixas de concentração para cada composto analisado. Botucatu/SP, 2014. ....	32

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Formação da glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS). (Adaptado: SODEK, 2008)..... 11
- Figura 2. Esquema representativo da metabolização do glutamato, com enzimas, aminoácidos e organelas envolvidos. (Adaptado DAUBRESSE et al., 2006 e TAIZ; ZEIGER, 2013)..... 13
- Figura 3. Estrutura química do amônio glufosinate, bialafos, alanina e fosfinotricina. (MONTAGUE et al., 2007)..... 15
- Figura 4. Estrutura química dos isômeros [A] L- glufosinate e [B] D- glufosinate (MÜLLER et al., 2001). ..... 15
- Figura 5. Estruturas químicas dos metabólitos do glufosinate, onde as setas em cinza representam a principal via (OECD, 2002). ..... 16
- Figura 6. Reação de metabolização da molécula L- glufosinate do herbicida amônio glufosinate em N-acetyl-L-glufosinate, catalisada pela enzima PAT, em plantas que apresentam resistência ao herbicida. .... 17
- Figura 7. Esquema das vias de degradação aeróbica do amônio glufosinate no solo, onde as setas em cinza representam a via principal de degradação (FAO, 1998). 17
- Figura 8. Ilustração simplificada da rota de formação da glutamina e ponto de inibição da enzima GS pelo herbicida amônio glufosinate, seguida de acúmulo de glutamato e interrupção da síntese de glutamina. (Adaptado: TAIZ; ZEIGER, 2013)..... 19
- Figura 9. Experimento conduzido em casa de vegetação no NuPAM. Botucatu/SP, 2014. .... 23
- Figura 10. Pulverizador estacionário laboratório NuPAM. Botucatu/SP, 2014. .... 25
- Figura 11. Sequência dos processos de extração e determinação de amônia: pesagens (garrafa, garrafa + matéria fresca da amostra, garrafa + matéria fresca da amostra + água acidificada), preenchimento com a água previamente acidificada, sonicação em banho de ultrassom, retirada das folhas após a sonicação, pipetagem das amostras e reagentes, agitação, e determinação em espectrofotômetro. Botucatu/SP, 2014. .... 27
- Figura 12. Sequência do protocolo de extração e determinação dos compostos: maceração das folhas com nitrogênio líquido, pesagem, acondicionamento em tubos falcon com capacidade para 15 mL, adição da solução extratora metanol: água, banho de ultrassom, centrifugação e determinação em cromatografia líquida. Botucatu/SP, 2014. .... 29
- Figura 13. Cromatograma do glutamato com os respectivos fragmentos na concentração de 200 ng ml<sup>-1</sup>. Botucatu/SP, 2014. .... 30
- Figura 14. Cromatograma do glufosinate com os respectivos fragmentos na concentração de 200 ng ml<sup>-1</sup>. Botucatu/SP, 2014. .... 31
- Figura 15. Cromatograma do glufosinate com os respectivos fragmentos na concentração de 200 ng ml<sup>-1</sup>. Botucatu/SP, 2014. .... 31

- Figura 16. Modelo do equipamento fluorômetro portátil utilizado. Botucatu/SP, 2013. (SILVA, 2012). ..... 33
- Figura 17. Fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre as cultivares: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL e [C] FM 975WS em função dos dias após a aplicação do herbicida. --- Representa o momento da aplicação. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014. .... 35
- Figura 18. Taxa de transporte de elétrons em função dos dias após a aplicação do herbicida amônio glufosinate sobre as cultivares: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL E [C] FM 975WS. --- Representa o momento da aplicação. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014..... 37
- Figura 19. Teor de amônia (mg de amônia por kg de massa de matéria fresca) das cultivares de algodão: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL e [C] FM 975WS em função de quatro doses (L) do herbicida amônio glufosinate. Médias dos tratamentos agrupadas por DAE seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014. .... 40
- Figura 20. Teor de glutamato (mg de glutamato por kg de massa de matéria fresca) das cultivares de algodão: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL e [C] FM 975WS em função de quatro doses (L) do herbicida amônio glufosinate. Médias dos tratamentos agrupadas por DAE seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014. .... 42
- Figura 21. Teor de glufosinate (mg de glufosinate por kg de massa de matéria fresca) das cultivares de algodão: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL e [C] FM 975WS em função de quatro doses (L) do herbicida amônio glufosinate. Médias dos tratamentos agrupadas por DAE seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014. .... 44
- Figura 22. Teor de serina (mg de serina por kg de massa de matéria fresca) das cultivares de algodão: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL e [C] FM 975WS em função de quatro doses (L) do herbicida amônio glufosinate. Médias dos tratamentos agrupadas por DAE seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014. .... 46
- Figura 23. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 993 aos 3 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. .... 50
- Figura 24. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 993 aos 6 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. .... 50
- Figura 25. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 993 aos 16 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. .... 50

Figura 26. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 3 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. ....	51
Figura 27. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 6 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. ....	51
Figura 28. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 24 DAA: testemunha; dose de 1L; 2L e 3L, respectivamente, submetidas a uma única aplicação. Botucatu/SP, 2014. ...	52
Figura 29. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 35 DAA, na dose de 1L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. ....	52
Figura 30. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 35 DAA, na dose de 2L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. ....	52
Figura 31. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 35 DAA, na dose de 3L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. ....	53
Figura 32. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 3 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. ....	53
Figura 33. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 6 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. ....	53
Figura 34. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 24 DAA: testemunha; dose de 1L; 2L e 3L, respectivamente, submetidas a uma única aplicação. Botucatu/SP, 2014. ....	54
Figura 35. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 35 DAA, na dose de 1L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. ....	54
Figura 36. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 35 DAA, na dose de 2L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. ....	54
Figura 37. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 35 DAA, na dose de 3L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014. ....	55

## 1 RESUMO

As cultivares de algodão Liberty Link<sup>®</sup> são aquelas que resistem à aplicação do amônio glufosinate a uma dose que normalmente seria recomendada para os demais biótipos da espécie. Estas cultivares de algodão são constituídas geneticamente com um gene que codifica a produção da enzima fosfinotricina acetil transferase (PAT), responsável pela acetilação do amônio glufosinate, inativando-o na planta. A cultivar de algodão FiberMax<sup>®</sup> 975 WideStrike por também apresentar em seu DNA o gene PAT apresentaria o comportamento de seu metabolismo intermediário às cultivares convencional e Liberty Link<sup>®</sup>. O objetivo do trabalho foi avaliar as alterações metabólicas e a intoxicação das plantas de algodão WideStrike<sup>®</sup> comparadas a plantas Liberty Link<sup>®</sup> e convencionais, quando submetidos ao herbicida amônio glufosinate. Os estudos foram conduzidos em casa de vegetação na Faculdade de Ciências Agrônomicas - FCA / UNESP - Campus de Botucatu (SP). Dois experimentos foram instalados simultaneamente utilizando cultivares as cultivares transgênicas e convencional, sendo o primeiro para avaliar a intoxicação e alterações na fotossíntese e o segundo para quantificar compostos relacionados a rota de ação do herbicida amônio glufosinate. Foram semeadas 5 sementes por vaso de três cultivares de algodão FM 993 (convencional), FM 975WS<sup>®</sup> (transgênica) e IMACD 6001LL<sup>®</sup> (transgênica) e, aos 15 dias após a emergência (DAE) foi realizado o desbaste das plantas, mantendo duas plantas por vaso. Quando as plantas apresentaram 2 folhas verdadeiras (25 dias após emergência) realizou-se a primeira aplicação dos

tratamentos, sendo as demais aplicações aos 40 e 55 DAE. As doses calculadas para cada tratamento foram 200 g i.a. ha<sup>-1</sup>, 400 g i.a. ha<sup>-1</sup> e 600 g i.a. ha<sup>-1</sup> do herbicida amônio glufosinate (Finale). Realizaram-se as coletas das folhas e determinações do teor de amônia, glutamato, glufosinate e serina aos 2 dias após a aplicação dos tratamentos. A partir das variáveis de comportamento do metabolismo avaliadas para as três cultivares de algodão, conclui-se a cultivar de algodão FM 975WS apresentou comportamento metabólico semelhante à cultivar IMACD 6001LL (resistente ao herbicida amônio glufosinate) e diferente da cultivar FM 993 (convencional). Até a dose comercial, a cultivar FM 975WS: manteve os níveis de amônia e glutamato, não acumulando amônia e glutamato; metabolizou glufosinate ao ponto de não propiciar intoxicação e morte das plantas; preservou os níveis de produção de serina; manteve as mesmas taxas do transporte de elétrons; não ocasionou elevada intoxicação às plantas.

---

Palavras-chave: amônia, glutamato, serina, fitointoxicação.

INTOXICATION AND METABOLIC CHANGES OF SENSITIVE AND RESISTANT COTTON TO AMMONIUM GLUFOSINATE. Botucatu, 2014. Number of sheets: 65p. Dissertation (Master in Agronomy / Agriculture) - Faculty of Agricultural Sciences, "Júlio de Mesquita Filho" State University.

Author: DÉBORA DE OLIVEIRA LATORRE

Adviser: CAIO ANTONIO CARBONARI

Co-adviser: ANDERSON LUIS CAVENAGHI

## **2 SUMMARY**

The Liberty Link cotton cultivars are those that resist a dose of ammonium glufosinate application that normally would be recommended for other biotypes species. These cotton plants are constitute genetically with gene that encodes the production of enzyme phosphinothricin acetyl transferase (PAT) responsible for the acetylation of glufosinate ammonium, inactivating it in the plant. The cotton cultivar FiberMax® 975 WideStrike has present in its DNA the gene PAT and present intermediate metabolism to conventional cultivars and Liberty Link ®. The purpose of the study was to evaluate the metabolic changes and the intoxication of WideStrike®cotton plants compared with Liberty Link ® and conventional plants, when treated to ammonium glufosinate herbicide. The studies were carried out in a greenhouse at the Faculty of Agricultural

Sciences, "Júlio de MesquitaFilho" State University – Botucatu Campus (SP). Were conducted two experiments simultaneously using the transgenic and conventional cultivars, the first one to evaluate the toxicity and changes in photosynthesis and the second to quantify compounds related to the herbicide ammonium glufosinate action route. Five seeds were sown of each cultivar per pot of the three cotton cultivars FM 993 (non-genetically modified), FM 975WS® (genetically modified) and IMACD 6001LL® (genetically modified) and at 15 days after emergence (DAE) was performed thinning of the plants, keeping two plants per pot. When the plants had two true leaves (25 days after emergence) held the first treatment application, and other applications at 40 and 55 DAE. The doses calculated for each treatment were 200 g ai ha<sup>-1</sup>, 400 g ai ha<sup>-1</sup> and 600 g ai ha<sup>-1</sup> of the herbicide ammonium glufosinate (Finale). The leaves were harvested and the determinations of concentration of ammonia, glutamate, serine and glufosinate were realized 2 days after application treatment. Based on the variables of the metabolism behavior evaluated for the three cotton cultivars, it was concluded that the cotton cultivar FM 975WS showed similar metabolic behavior to cultivate IMACD 6001LL (herbicide glufosinate ammonium resistant) and different cultivar FM 993 (non-genetically modified). Until the commercial dose to cultivate FM 975WS: maintained the levels of ammonia and glutamate, not accumulating ammonia and glutamate; metabolized glufosinate to the point of not providing toxicity and death of plants; preserved the levels of production of serine; maintained the same rates of electron transport; did not resulted high toxicity to plants.

---

Keywords: ammonia, glutamate, serine, herbicide injury.

### **3 INTRODUÇÃO**

O Brasil é o quinto produtor e exportador mundial de algodão, uma cultura de grande importância do ponto de vista econômico e social. Um expressivo aumento de sua participação no cenário mundial iniciou-se após o deslocamento da produção para a região dos Cerrados, que apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento da cultura. Somada às condições climáticas está a utilização de variedades adaptadas às condições edafoclimáticas da região, tolerância a algumas pragas, doenças e plantas daninhas e, com maior potencial produtivo, além da utilização de modernas técnicas de cultivo.

Um dos principais tratamentos culturais da cultura do algodão é o controle de plantas daninhas, que deve ser realizado ao longo do ciclo, principalmente no período denominado de Período Crítico de Prevenção à Interferência (PCPI), correspondente dos 8 aos 70 dias após emergência (DAE) das plantas. Existem diferentes técnicas e combinações destas para controle de plantas daninhas, tais como métodos culturais, mecânicos e químicos, sendo o controle químico por meio da aplicação de herbicidas o principal método de controle.

O evento de culturas geneticamente modificadas resistentes aos herbicidas surgiu da necessidade de facilitar o manejo de plantas daninhas na cultura e possibilitar a seletividade de herbicidas para as culturas. Atualmente são registrados e

aprovados pela Comissão Técnica de Biossegurança dois eventos de algodão resistentes a herbicidas, ao glyphosate e ao amônio glufosinate, denominados de Roundup Ready<sup>®</sup> e Liberty Link<sup>®</sup>, respectivamente.

O algodão Liberty Link<sup>®</sup> é resistente ao amônio glufosinate, que é um herbicida do grupo dos herbicidas inibidores da glutamina sintetase (GS), obtido de uma toxina natural – fosfinotricina, a partir de duas espécies bactérias de *Streptomyces viridochromogenes* e *hygroscopicus*. A GS é uma enzima que está envolvida na síntese do aminoácido glutamina, através da adição de uma molécula de amônio (forma inorgânica) no aminoácido glutamato.

O isômero óptico levogiro do amônio glufosinate atua como um análogo estrutural da GS, inibindo então a formação da glutamina e rompendo o ciclo do nitrogênio no interior das células. Uma série de eventos são desencadeadas a partir desse bloqueio, como acúmulo de amônia no interior celular, formação de radicais livres, acúmulo de glioxilato, paralisação da fotossíntese e até morte das plantas.

Essa resistência ao amônio glufosinate é conferida pelo gene *bar*, que codifica a síntese da enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), que metaboliza rapidamente o glufosinate em um composto estável e não tóxico para a planta, o ácido 2-acetamido-4-methylphosphinico-butanóico (N-acetyl-L-glufosinate - NAG) ou ácido 4-metilfosfinico-butanóico (MPB).

Para o desenvolvimento de novos eventos de transgenia relacionados com resistência a insetos e doenças, normalmente são inseridos juntamente com os genes de interesse um gene de resistência a herbicidas, para assim facilitar as avaliações de sucesso ou insucesso de inserção do gene de interesse na planta.

Um exemplo é a cultivar de algodão FM 975 WideStrike<sup>®</sup>, que apresenta resistência a algumas pragas da cultura, porém no processo de obtenção da transgenia foi inserido como marcador de seleção para o gene *bar*. Plantas que apresentam o gene *bar* como um marcador, apresentam um comportamento diferenciado quando submetidas ao tratamento com o herbicida amônio glufosinate. Contudo, ainda não existem estudos detalhados do comportamento metabólico destas plantas em relação a intoxicação, mecanismos de desintoxicação, após o tratamento com o herbicida.

A cultivar de algodão FM 975 WS<sup>®</sup> por apresentar em seu DNA o gene PAT apresentaria o comportamento de seu metabolismo intermediário às cultivares convencional e Liberty Link<sup>®</sup>. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar as alterações metabólicas e a intoxicação das plantas de algodão WideStrike<sup>®</sup> comparadas a

plantas Liberty Link<sup>®</sup> e convencionais, quando submetidos ao herbicida amônio glufosinate.

## **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Cultura do Algodão**

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é conhecido há mais de 10.000 anos e, apresenta como centro de origem a Índia. É uma das culturas mais importantes do mundo, em termos econômicos e sociais, sendo produzido em mais de 60 países, nos cinco continentes. Os maiores produtores da fibra são: China, Índia, Estados Unidos, Paquistão e Brasil, somando uma área total mundial de aproximadamente 35 milhões de hectares, com uma produção de 25,16 milhões de hectares na última safra (ASSOCIAÇÃO SUL-MATOGROSSENSE DOS PRODUTORES DE ALGODÃO, 2010; COTTON INCORPORATED, 2014).

No Brasil é a quinta cultura de grãos em área planta, ficando atrás das culturas do milho, soja, arroz e feijão. Nesta última safra 13/14 a cultura do algodão registrou uma área a ser cultivada de 1.090,1 mil hectares, conferindo um aumento de 22,1% (197,8 mil hectares) em relação aos 894,3 mil hectares plantados na safra anterior (2013). A estimativa é de que a produção de caroço de algodão seja de 2.523,5 mil toneladas (25% superior à safra passada 12/13). O estado do Mato Grosso é o líder nacional em produção e responsável por 55,9% da produção, seguido pela Bahia e Goiás (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014).

A produtividade da cultura do algodão é influenciada por diversos fatores, como tipo de solo; condições climáticas e ambientais (temperatura, regime pluviométrico, luz, umidade) (RUEDELL, 1995; PAES; REZENDE, 2001; CONSTANTIN et al., 2005) cultivares utilizadas; tratos culturais adotados; sistema de plantio e cobertura vegetal (MATEUS et al., 2004; CORREIA et al., 2006; FERREIRA et al., 2007; MESCHEDÉ et al., 2007); presença de pragas (EVANGELHISTA Jr et al., 2004), doenças e plantas daninhas na área de cultivo (PITELLI, 1987). As plantas daninhas são o principal fator biótico de influência na cultura do algodão, que apresenta grande suscetibilidade às interferências ocasionadas por elas, podendo ocasionar perdas superiores a 90% de produtividade (FREITAS et al., 2002).

O processo de interferência das plantas daninhas se inicia quando fatores como água, luz e nutrientes tornam-se limitantes para a cultura do algodão. Segundo Pitelli (1985) o grau de interferência das plantas daninhas será dependente tanto dos fatores ligados a própria cultura (densidade, espaçamento e cultivar) quanto dos fatores ligados à comunidade infestante (densidade populacional das plantas daninhas na área de cultivo, distribuição pela área, potencial alelopático, hospedeira de pragas e/ou doenças).

Em função da densidade de semeadura da cultura, sistema de cultivo (plantio direto, convencional, cultivo mínimo), densidade e espécies da comunidade infestante, entre outros fatores, o Período Anterior à Interferência (PAI) e Período Total de Prevenção à Interferência (PTPI) podem variar de 8 a 15 dias após a germinação e de 60 a 70 dias após a germinação, respectivamente (SALGADO et al., 2002; FREITAS et al., 2002; CARDOSO et al., 2010).

Existem alguns fatores limitantes relacionados à morfologia, fisiologia e bioquímica que influenciam no desenvolvimento do algodoeiro, como: arquitetura planofilar das folhas; baixa transmissibilidade da luz via folhas, provocando baixa taxa fotossintética nas folhas sombreadas; metabolismo fotossintético do tipo C3 (BENEDICT, 1984); a enzima de fixação do dióxido de carbono, a Rubisco (Ribulose 1,5 – bifosfato carboxilase) apresenta baixa afinidade catalítica pelo substrato, resultando em maior atividade oxigenase; elevadas taxas de fotorrespiração (HESKETH, 1967); baixa taxa de translocação de assimilados via floema com consequente acumulação de amido nas folhas, podendo causar ruptura das membranas internas dos cloroplastos (ASHLEY, 1972; BELTRÃO, 2004). A soma de todos estes fatores limitantes resulta num baixo desenvolvimento inicial das plantas (AZEVEDO et al., 1993), que as tornam mais

suscetíveis a competição com as plantas daninhas, principalmente as que apresentam metabolismo C4, cujo mecanismo de fixação de carbono é mais eficiente comparando com o algodoeiro (C3) (BENEDICT, 1984).

Dentre as principais espécies que competem com a cultura do algodão, pode-se destacar alguns integrantes da família Poaceae, como: capim marmelada – *Brachiaria plantaginea*, capim colchão – *Digitaria* spp., grama seda – *Cynodon dactylon*, trapoeraba – *Commelina* spp.; da família Cyperaceae: as tiriricas – *Cyperus* spp.; e as representantes dicotiledonares, como: leiteiro – *Euphorbya heterophylla*, picão preto – *Bidens pilosa*, carrapicho de carneiro – *Acanthospermum hispidum*, cordas de viola – *Ipomoea* spp., caruru – *Amaranthus* spp., entre outras (CHRISTOFFOLETI et al., 2011).

O sucesso no controle de plantas daninhas é um dos principais fatores que acarretarão em maiores produtividades da cultura. O melhor método de controle é a adoção de diferentes técnicas de manejo, assim um método complementa o outro, ampliando a faixa de controle das diferentes espécies infestantes. Pode-se citar como os principais métodos de controle o preventivo, físico, cultural, biológico, mecânico e químico. Alguns fatores específicos de cada região e propriedade é que determinarão quais os melhores métodos e manejos a serem adotados, e são dependentes da extensão da área a ser cultivada, do tipo de solo, do manejo anterior, das espécies daninhas presentes na área, da disponibilidade de mão de obra, equipamentos, herbicidas (PITELLI; DURIGAN, 1984; PITELLI, 1987; CHRISTOFFOLETI et al., 2011; CONSTANTIN, 2011).

Em decorrência do aumento das grandes áreas de produção altamente tecnificadas, como Bahia e Mato Grosso por exemplo, o principal método de controle adotado é o químico. Dentre os principais herbicidas utilizados, o amônio glufosinate é de grande importância no controle em pós emergência das plantas daninhas, utilizando-se aplicação com jato dirigido, visto que ainda a maioria das áreas de produção utilizam cultivares convencionais.

No ano de 2008 foi autorizado pela CTNBio a introdução no Brasil de cultivares de algodão geneticamente modificadas resistentes ao herbicida amônio glufosinate, denominadas de Liberty Link<sup>®</sup> (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBio, 2008). Atualmente no mercado brasileiro só existem três cultivares registradas com esta tecnologia (FiberMax 966LL, FiberMax 951LL e IMACD 6001LL), com potencial expansão de área de plantio e desenvolvimento de um maior número de cultivares que sejam adaptadas a diferentes

condições edafoclimáticas (FREIRE et al., 2012). Além de resistência ao amônio glufosinate, existem também no Brasil algumas cultivares com resistência ao herbicida glyphosate: Algodão Roundup Ready, Roundup Ready Flex e GlyTol (FREIRE et al., 2012).

#### 4.2 Rota de Incorporação do Nitrogênio nas Plantas

O nitrogênio é o segundo elemento mais importante no ciclo de vida das plantas, sendo o carbono o primeiro. Ele tem um papel de tamanha importância na formação de compostos, como aminoácidos, proteínas, DNA, RNA e em outras estruturas celulares. Embora seja o elemento mais abundante na atmosfera, as plantas não conseguem metabolizá-lo na forma gasosa e, para que então elas sejam possibilitadas de metabolizá-lo entram em ação algumas bactérias e cianobactérias capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio. No solo, o nitrogênio pode ser transformado em amônio ou nitrato, dependendo das condições do ambiente (como pH) (CABALLERO, 2011). As plantas ao absorverem nitrogênio na forma de nitrato, assimilam-no em nitrito e amônio, após uma série de reações de redução (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A presença de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), proveniente da assimilação do nitrato ou da fotorrespiração, nas células vegetais é prejudicial devido à sua toxicidade, portanto há necessidade de sua rápida assimilação. Os tecidos das plantas apresentam um eficiente sistema de assimilação desse amônio, que é ativado sob baixas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . A enzima responsável por esta assimilação é a glutamina sintetase (GS), que catalisa a união do  $\text{NH}_4^+$  com glutamato para formar glutamina (Figura 1). Para ocorrência desta reação, é necessária a hidrólise de uma molécula de ATP e envolve um cátion bivalente, como o  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Co}^{2+}$  como um cofator (SODEK, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013).

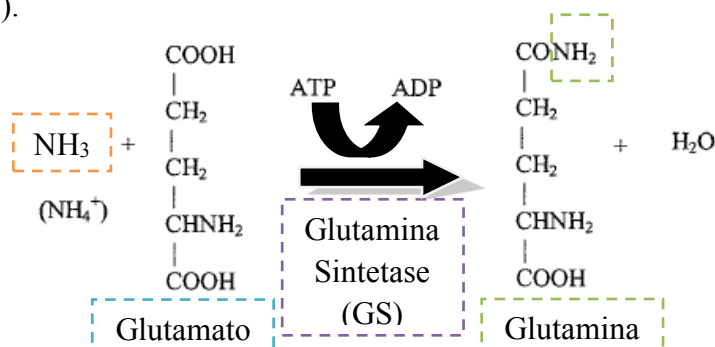


Figura 1. Formação da glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS). (Adaptado: SODEK, 2008).

A enzima GS está presente nas plantas em duas regiões: no citosol e nos plastídeos das raízes ou nos cloroplastos da parte aérea. As GSs presentes no citosol são expressas durante a germinação de sementes ou no feixe vascular das raízes e partes aéreas, produzindo glutamina para o transporte do nitrogênio intracelular. A GS dos plastídeos das raízes forma o nitrogênio amida que é consumido localmente, enquanto que a GS dos cloroplastos da parte aérea reassimila o  $\text{NH}_4^+$  da fotorrespiração (MIFLIN; LEA, 1977; LAM et al., 1996). As duas isoformas da GS presente nas raízes e nos cloroplastos das folhas apresentam diferente sensibilidade ao herbicida, sendo a isoforma da GS radicular mais sensível ao amônio glufosinate em *Sinapis alba* e *Triticum aestivum* (WILD; MANDERSCHIED 1984; MANDERSCHIED; WILD, 1986).

Com a síntese de glutamina nos cloroplastos, os níveis deste aminoácido aumentam e estimulam a ação da enzima glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT), que transfere o grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato, originando duas moléculas de glutamato. As plantas apresentam duas classes de GOGAT, uma que recebe elétrons do NADH (localizada nos plastídeos de tecidos não fotossintéticos) e outra que recebe elétrons da ferredoxina (FD) (localizada nos cloroplastos das folhas principalmente). Uma das moléculas de glutamato retorna para assegurar a continuação da GS e, a outra pode ser consumida na formação de novos aminoácidos, via transaminação com diversos cetoácidos, entre eles o glioxilato, formando aminoácidos e recuperando o 2-oxo- glutarato (TEMPLE et al., 1998; SODEK, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013; MATHEWS; HOLDE, 1990).

O amônio pode ainda ser assimilado por uma rota alternativa, pela glutamato desidrogenase (GDH), que catalisa uma reação (reversível) entre o 2-oxoglutarato,  $\text{NH}_4^+$  e NAD(P)H, formando assim o aminoácido glutamato (Figura 2). A forma NADH é encontrada nas mitocôndrias, enquanto que a forma NADPH ocorre nos cloroplastos de órgãos fotossintéticos. Embora até a década de 80 acreditava-se que a GDH era a enzima responsável pela maior parte da incorporação do  $\text{NH}_4^+$  para formação de glutamato, Woo e Osmond (1982) e Fentem et al. (1983) propuseram o papel da GS e da GOGAT no processo de transaminação. Portanto, a GDH não pode substituir a rota da GS-GOGAT para assimilação do amônio, assim, sua principal função é desaminar o glutamato (TEMPLE et al., 1998; SODEK, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013).

A GS além das funções de assimilação do amônio e da síntese de aminoácidos, ela também atua na fotorrespiração e na manutenção de baixos níveis de

glioxilato para prevenir a inibição da ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase (Rubisco), que é uma enzima chave na fixação de carbono (STEPHENSON et al., 2006).

O processo de fotorrespiração envolve três organelas: cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias. No cloroplasto, caso a enzima ribulose 1,5 bisfosfato (Rubisco) atue com atividade oxigenase, originará glicolato. Duas moléculas de glicolato e uma de glutamato saem do cloroplasto e migram para o peroxissomo, onde o glicolato é oxigenado formando glioxilato. No peroxissomo tanto o glutamato quanto o glioxilato são catalisados pela mesma enzima glioxilato:glutamato sintetase (GGAT) a 2-oxoglutarato e glicina, respectivamente. A glicina flui para as mitocôndrias, onde se une a outra molécula de glicina formando serina, amônio e gás carbônico. A serina recém sintetizada flui para o peroxissomo e forma glicerato. O amônio e o gás carbônico das mitocôndrias e o 2-oxoglutarato e glicerato do peroxissomo migram para o cloroplasto (TAIZ; ZEIGER, 2013) (Figura 2).

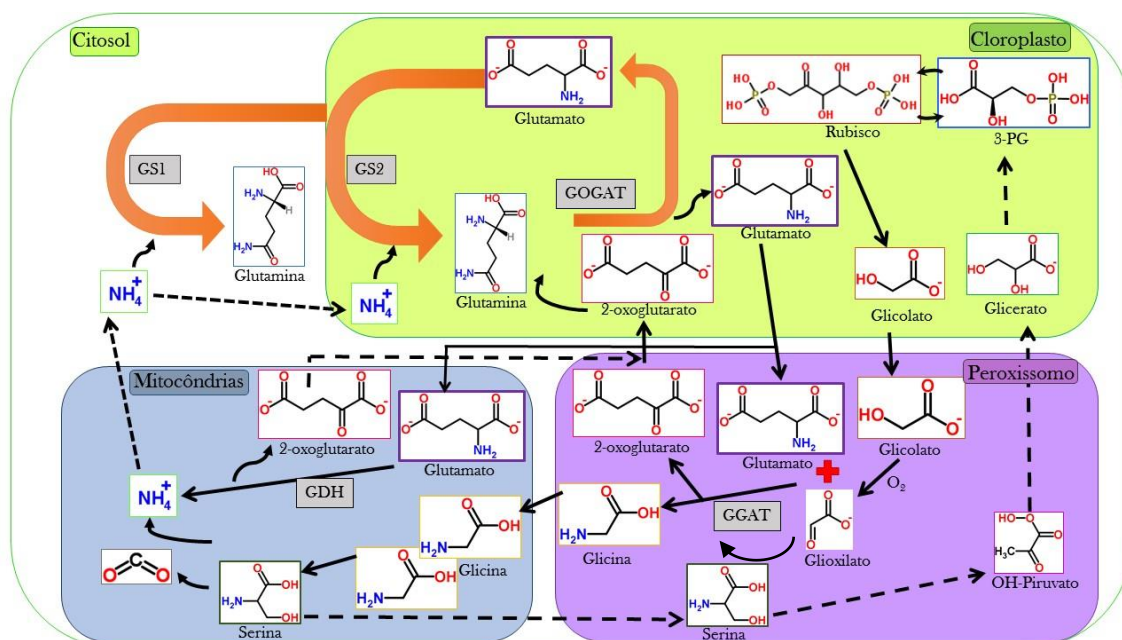


Figura 2. Esquema representativo da metabolização do glutamato, com enzimas, aminoácidos e organelas envolvidos. (Adaptado DAUBRESSE et al., 2006 e TAIZ; ZEIGER, 2013).

#### 4.3 Amônio Glufosinate

O amônio glufosinate é o único ingrediente ativo do grupo dos herbicidas inibidores da glutamina sintetase comercializado no Brasil. É um herbicida

não seletivo, com baixa translocação e amplo espectro de controle de plantas daninhas (monocotiledôneas e dicotiledôneas). Sua recomendação de uso é em aplicação na pós-emergência das plantas daninhas, com jato dirigido, nas culturas de alface, algodão, banana, batata, café, citros, eucalipto, maçã, milho, nectarina, pêsego, repolho, soja, trigo e uva; em dessecação no sistema de plantio direto, em soja e trigo; e na pós-emergência total do algodoeiro Liberty Link<sup>®</sup> (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). É um herbicida de amplo espectro de ação e não apresenta seletividade de modo geral tanto para plantas monocotiledôneas quanto para as dicotiledôneas. Somente em plantas Liberty Link<sup>®</sup> este herbicida apresenta seletividade, onde o ingrediente ativo pode ser metabolizado em algum composto não tóxico ou não metabolizado.

#### 4.3.1 Características Físico-Químicas e Processos de Degradação

O amônio glufosinate é um produto extremamente tóxico (Classificação toxicológica I), altamente solúvel em água –  $1,37 \cdot 10^6 \text{ mg L}^{-1}$ ; tem comportamento de ácido fraco –  $\text{pKa} < 2,0$ ; coeficiente de partição N- octanol/água ( $K_{ow}$ )  $< 0,1$ ; e não é volátil – pressão de vapor  $< 0,1 \text{ mPa}$  (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE - ARS, 2009; RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

Quanto à adsorção e lixiviação, sabe-se que é fracamente adsorvido pelos coloides do solo e, que cada solo apresenta seu coeficiente de partição  $K_{ow}$ /carbono orgânico ( $K_{oc}$ ): *Silt loam* – 352, *Silt loam* – 156, *Sand* – 9,6 e *Volcanic ash* – 1229 (ARS, 2009). É altamente móvel e lixiviável, porém não há detecção do ingrediente ativo em profundidades superiores a 15 cm provavelmente por ser rapidamente decomposto pelos microrganismos do solo. Possui meia vida no solo de seis a 40 dias, em função do tipo de solo: *Silt loam* - 3,7; *Silt loam* - 8,3; *Loamy sand* - 6,4; *Marchy soil* – 6,6 e *Peat soil* – 10. (ARS, 2009; RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

Existem duas formulações do ingrediente ativo comercializadas no mercado: Finale<sup>®</sup> e Liberty<sup>®</sup>, ambos pertencentes à Bayer Crop Science, sendo Finale<sup>®</sup> o herbicida mais utilizado por apresentar menor classe toxicológica. O Finale<sup>®</sup> é comercializado na formulação de concentrado solúvel, com  $200 \text{ g L}^{-1}$  (20% m/v) do ingrediente ativo e  $898 \text{ g L}^{-1}$  (89,8% m/v) de ingredientes inertes: Sal sódico de poliglicol éter sulfato (Alkapon CN, Genapol LRO Pasta) – Emulsificante ( $333,00 \text{ g L}^{-1}$ ), Polidimetilsiloxano e sílica (Rhodosil Antifoam 481) – Antiespumante ( $2,80 \text{ g L}^{-1}$ ), Éster Metílico do Propilenoglicol (Dowanol PM) – Solvente ( $110,00 \text{ g L}^{-1}$ ), Corante azul de

trifenil metano ( Azul Ácido DUASYN AE 02) – corante (0,05 g L<sup>-1</sup>) e água (463,15 g L<sup>-1</sup>) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2003; ANDREI, 2009).

O amônio glufosinate é um sal de amônio derivado de uma toxina natural isolada a partir de duas espécies bacterianas: *Streptomyces viridochromogenes* e *S. hygrosopicus* (DUKE; LYDON, 1987). Essas duas espécies bacterianas produzem uma substância com efeito herbicida chamada bialafos, composta por três peptídeos: 2 alaninas e 1 fosfotricina (Figura 3). O bialafos é um pró herbicida, que é degradado em fosfotricina pelas plantas daninhas alvo (DUKE et al., 2000).

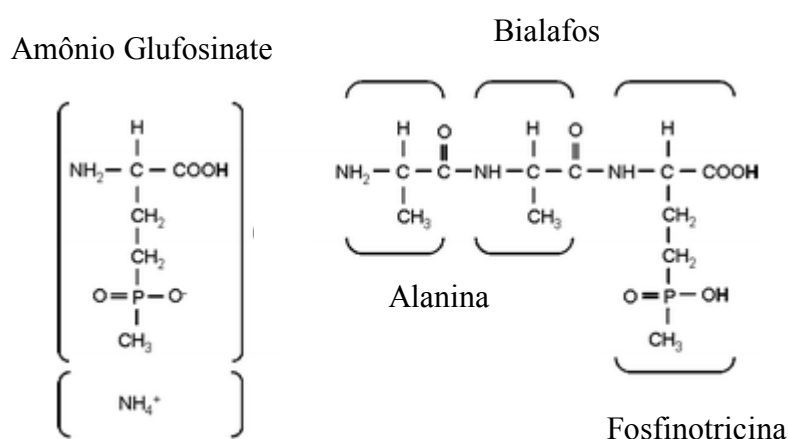


Figura 3. Estrutura química do amônio glufosinate, bialafos, alanina e fosfotricina. (MONTAGUE et al., 2007).

Apresenta em sua composição ammonium 4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]-DL-homoalaninate ou ammonium DL-homoalanin-4-yl(methyl) phosphinate, ou seja, é composto por dois isômeros óticos Dextrógiro (D) e Levógiro (L) da fosfotricina (que compõe um dos tripeptídeos do bialafos) (Figura 4). Contudo enquanto o L- glufosinate atua como um potente inibidor da enzima glutamina sintetase, o D-glufosinate não mostra atividade e não é metabolizado pelas plantas (DEVINE et al., 1993; DUKE; LYDON, 1993; RUHLAND et al., 2002; ANDREI, 2009).

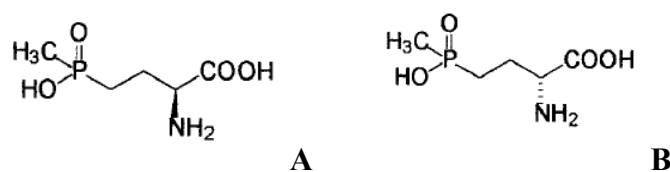


Figura 4. Estrutura química dos isômeros [A] L- glufosinate e [B] D- glufosinate (MÜLLER et al., 2001).

O L-glufosinate, em plantas convencionais (sem transgenia), inicialmente sofre uma reação de transaminação formando um composto intermediário, o ácido 2-oxo-4-(hydroxy-methyl-phosphinyl) butanóico (PPO). O PPO sofre uma descarboxilação formando o metabólito principal: o ácido 3-(hydroxy-methyl-phosphinyl) propanóico (MPP), que é considerado um composto estável nas plantas. O MPP ainda pode formar outro metabólito, o ácido 2-methylphosphinico acético (MPA). Uma rota alternativa para o PPO pode ser sua redução em ácido 2-hydroxy-4-(hydroxy-methyl-phosphinyl) butanóico (MHB) e o MHB pode perder uma hidroxila e formar o metabólito ácido 4-(hydroxy-methyl-phosphinyl) butanóico (MPB), que foi somente identificado em células em suspensão de milho e trigo. Na Figura 5 pode-se observar os metabólitos formados da degradação da molécula de glufosinate (DRÖGE et al.1992, 1994; KOMOBA et al, 1992; RUHLAND et al., 2002, 2004).

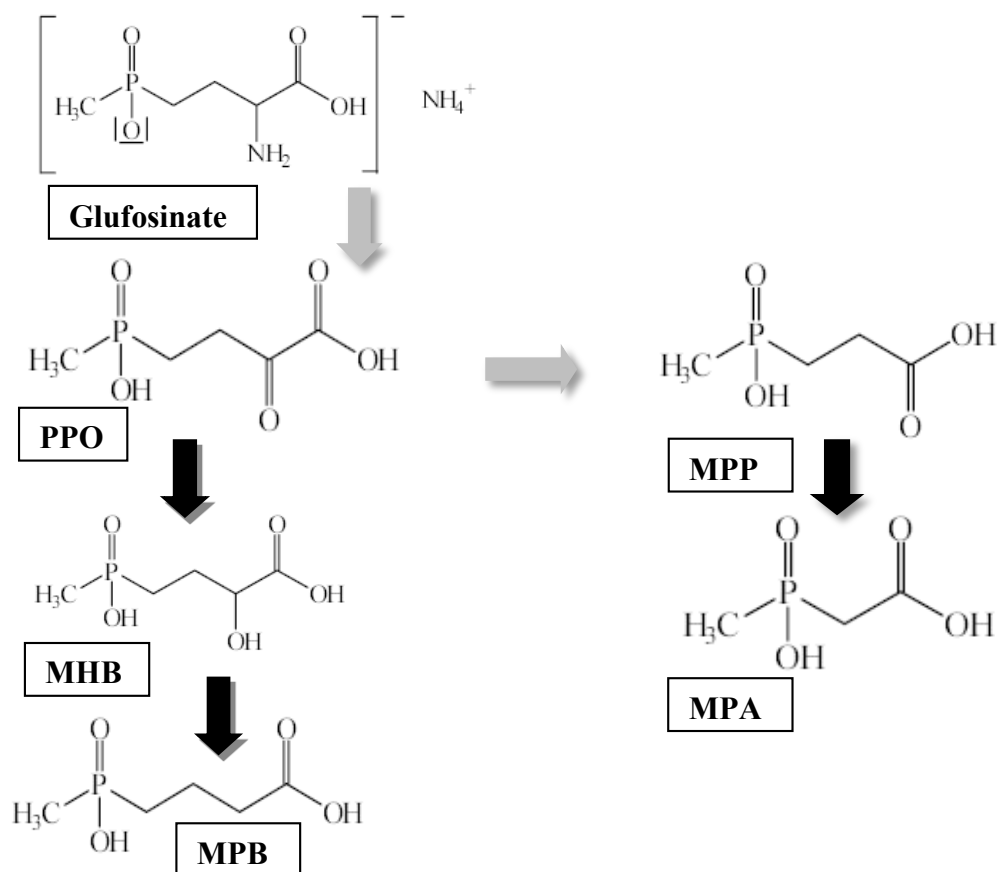


Figura 5. Estruturas químicas dos metabólitos do glufosinate, onde as setas em cinza representam a principal via (OECD, 2002).

O gene que confere às plantas resistência ao herbicida amônio glufosinate ativam uma enzima – PAT, que catalisa a reação de metabolização da molécula herbicida L-glufosinate através de um processo de acetilação, formando ácido 2-acetamido-4-methylphosphinico-butanóico (N-acetyl-L-glufosinate – NAG), como poder ser observado na Figura 6.

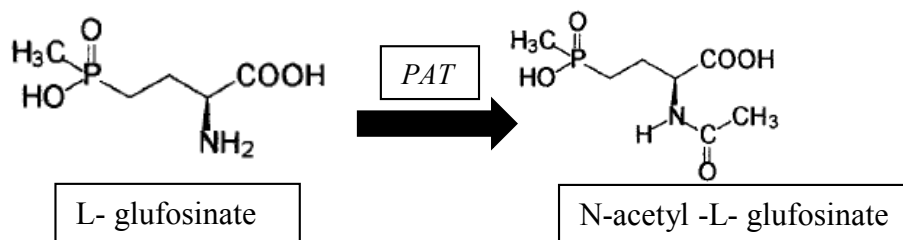


Figura 6. Reação de metabolização da molécula L- glufosinate do herbicida amônio glufosinate em N-acetyl-L-glufosinate, catalisada pela enzima PAT, em plantas que apresentam resistência ao herbicida.

O amônio glufosinate é rapidamente degradado no solo por microrganismos, em MPP, que é o principal produto da degradação do herbicida e, eventualmente em condições anaeróbicas e sob escuro, em dióxido de carbono (TEBBE; REBER, 1988; WSSA, 1994). O MPP não é fitotóxico e nem apresenta atividade herbicida. Em média, de 30 a 60% do MPP ainda pode ser detectado no solo 13 a 14 semanas após a aplicação (DORN et al., 1992) do amônio glufosinate. O NAG, metabólito normalmente encontrado em plantas transgênicas, é encontrado em menor quantidade no solo. Na Figura 7 pode-se observar a via de degradação do amônio glufosinate no solo.

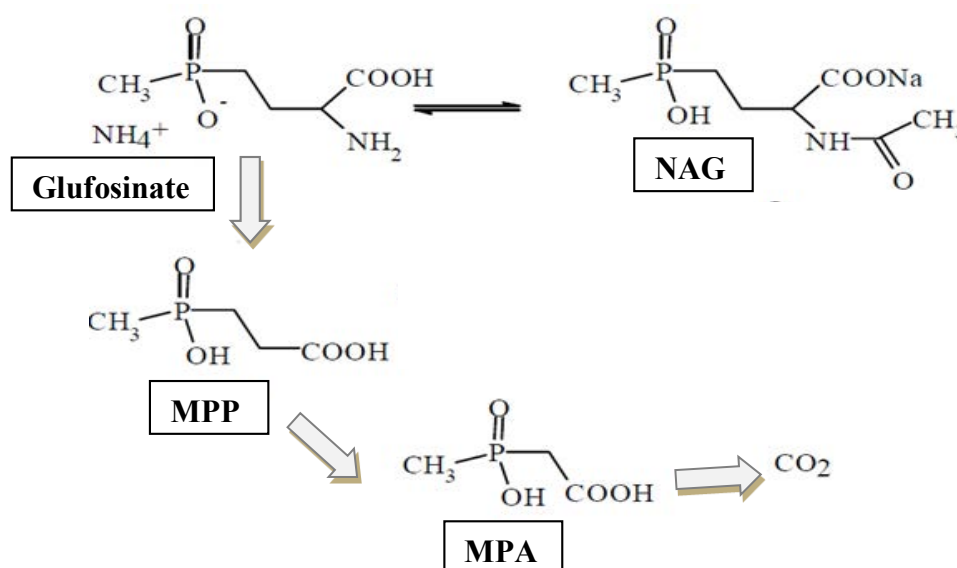


Figura 7. Esquema das vias de degradação aeróbica do amônio glufosinate no solo, onde as setas em cinza representam a via principal de degradação (FAO, 1998).

### 4.3.2 Modo de Ação

De acordo com Schewerdtle et al. (1981) e Anderson et al. (1993), o amônio glufosinate tem sido descrito como um herbicida sistêmico, pela capacidade de translocação ao bordo das folhas com a transpiração (via xilema). A absorção deste herbicida ocorre predominantemente pelas folhas, pecíolos e caules e seus danos são ocasionados no local de aplicação. De maneira geral, na maioria das espécies de plantas estudadas até o momento, as maiores concentrações de glufosinate no interior das plantas ocorreram nas primeiras 24 horas após a aplicação (HAAS; MÜLLER, 1987; SHELP et al., 1992; BERIAULT et al., 1999; COETZER, et al., 2001; SELLERS et al., 2004; SILVA, 2012).

A velocidade de absorção pode ser influenciada por alguns fatores abióticos e bióticos, como baixas temperaturas (redução da atividade metabólica) (DONN, 1982; LANGELÜDDEKE et al. 1988; MATHIASSEN; KUDSK, 1993), baixa umidade relativa (menor hidratação da cutícula) (ANDERSON, 1993; MATHIASSEN; KUDSK, 1993; PETERSEN; HURLE, 2001), hora da aplicação (SELLERS et al., 2004), chuvas até 5 ou 6 horas após a aplicação dos tratamentos (LANGELÜDDEKE et al. 1988; SILVA, 2012), queda na radiação fotossinteticamente ativa (KÖCHER, 1983), e espécie alvo (MERSEY et al., 1990; MASCHOFF et al., 2000).

De acordo com Everman et al. (2009) e Silva (2012), que compararam a velocidade de absorção do glufosinate em diferentes espécies de plantas daninhas e culturas, observaram que cada uma das espécies apresentou diferente tempo de absorção, porém, de maneira geral, 48 horas após a aplicação do herbicida a maior parte do ingrediente ativo já havia sido absorvido.

Apesar de apresentar alta solubilidade em água, comportamento de ácido fraco, propriedades químicas semelhantes ao glyphosate, o amônio glufosinate é minimamente translocado (MERSEY et al., 1990; STECKEL et al., 1997; ROMAN et al., 2007; EVERMAN et al., 2009). Everman et al. (2009) também estudou a velocidade de translocação e menos de 5% do produto foi translocado para as demais partes da planta (raízes, áreas acima e abaixo da folha tratada).

De acordo com Kleier (1988) e Shelp et al. (1992), o glufosinate apresenta características físico-químicas para se mobilizar no floema e xilema e, de certa forma apresenta uma baixa mobilidade. Steckel et al. (1997) encontraram em quatro espécies de plantas daninhas tratadas com glufosinate-C<sub>14</sub> mais que 88% do ingrediente

ativo nas folhas tratadas 72 horas após a aplicação e menos de 11% do glufosinate- $C_{14}$  absorvido, alcançou as raízes de todas as plantas estudadas. Alguns pesquisadores sugerem que a absorção, translocação e metabolização dos herbicidas diferenciam em função da sensibilidade ou tolerância das espécies de plantas aos herbicidas (RIDLEY; MCNALLY, 1985; WANAMARTA; PENNER, 1989; MERSEY et al., 1990; STECKEL et al. 1997).

O isômero L- glufosinate é um análogo estrutural do glutamato e inibe a ação da enzima glutamina sintetase, enquanto o isômero D- glufosinate não é um análogo estrutural (OECD, 2002; RUHLAND et al., 2004). A glutamina sintetase (GS) catalisa a reação de condensação do glutamato e amônio, formando glutamina e água no citoplasma e nos cloroplastos, porém ocorrendo predominantemente em cloroplastos de células com tecidos verdes (VAUGHN; DUKE, 1991; READE; COBB, 2002). O amônio glufosinate, por ser um análogo estrutural do substrato da enzima, liga-se de forma irreversível a ela, interrompendo a rota de formação da glutamina (Figura 8).

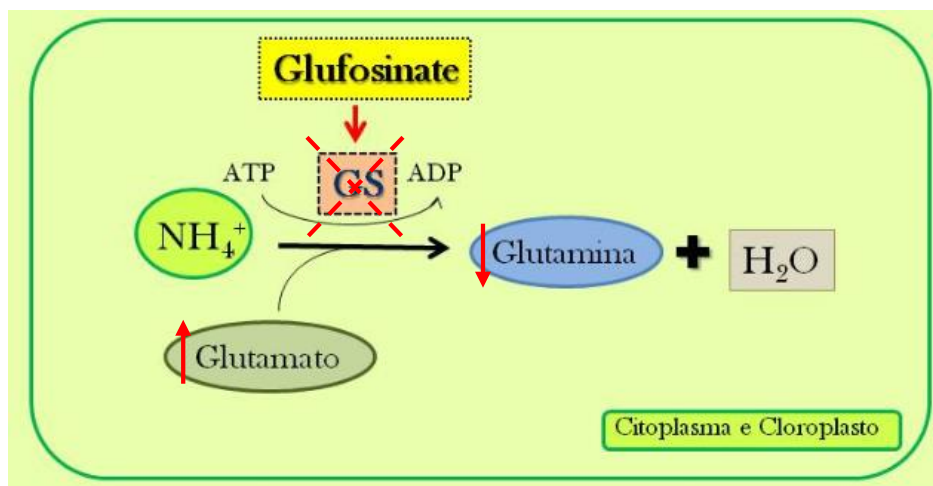


Figura 8. Ilustração simplificada da rota de formação da glutamina e ponto de inibição da enzima GS pelo herbicida amônio glufosinate, seguida de acúmulo de glutamato e interrupção da síntese de glutamina. (Adaptado: TAIZ; ZEIGER, 2013).

O amônio glufosinate age no sítio de ligação do glutamato com a enzima GS. A inibição da GS por este herbicida pode resultar em deficiência de glutamina e acúmulo de amônio na planta (TACHIBANA et al., 1986; WILD; WENDLER, 1990; LACUESTA et al., 1993), porém o acúmulo de amônio não é o fator direto responsável pelos efeitos tóxicos do glufosinate na planta. O ingrediente ativo deste herbicida pode

agir em quatro processos: 1) acúmulo de amônia nos cloroplastos; 2) inibição da enzima ribulose-bisfosfato carboxilase; 3) redução do pH no interior do cloroplasto, interferindo na síntese de ATP; e 4) inibição da redução do nitrato (ROSS; LEMBI, 1985; SANDMANN; BÖRGER, 1989; DEVINE et al., 1993).

A inibição da fotossíntese (WILD; WENDLER, 1990, 1993; WENDLER et al. 1989, 1992) após a aplicação do herbicida não é induzida pelas altas concentrações de amônia, mas pela inibição direta da ribulose-bisfosfato carboxilase, devido ao acúmulo de glioxilato e fosfoglicerato.

O acúmulo de glioxilato se deve em função da ausência de transaminação deste em glicina. Ziegler e Wild (1989) mostraram que a ausência de doadores do grupo amino impedem a transaminação de glioxilato em glicina na fotorrespiração. Uma possível hipótese seria também que a ausência de doadores do grupo amino resulte num retorno do glicerato ao Ciclo de Calvin (GIVAN, 1980), interferindo em toda rota da fotorrespiração (TACHIBANA et al., 1986). A inibição da ribulose-bisfosfato carboxilase reduz a fixação de carbono (WENDLER et al. 1992). A fotossíntese também é influenciada pela redução da concentração dos aminoácidos glutamina, glutamato, aspartato, alanina, glicina e serina (WILD; WENDLER, 1990; DOWNS et al., 1994; BARBERIS, 2012).

Os sintomas ocasionados por este herbicida são semelhantes aos ocasionados pelos herbicidas inibidores do fotossistema II (FSII), porém a fotossíntese não é o alvo principal, é um efeito secundário. Plantas tratadas com amônio glufosinate e submetidas a ausência de luz apresentam sintomatologia mais reduzida que plantas tratadas expostas à luz (HESS, 2000). Inicialmente aparecem alguns sintomas de encharcamento nas folhas e que podem ser visualizados de um a três dias após a aplicação do produto, evoluindo para clorose, secamento, necrose e morte total da planta em até duas semanas. No caule também podem ocorrer o surgimento de pontos necróticos após os sintomas visuais nas folhas.

#### **4.4 Tecnologia Liberty Link<sup>®</sup> e WideStrike<sup>®</sup>**

As cultivares de algodão Liberty Link<sup>®</sup> são aquelas que resistem à aplicação do amônio glufosinate a uma dose que normalmente seria recomendada para

os demais biótipos da espécie. Estas cultivares de algodão são constituídas geneticamente com um gene que codifica a produção da enzima fosfinotricina acetil transferase (PAT), responsável pela acetilação do amônio glufosinate, inativando-o na planta (MANDERSCHIED; WILD, 1986; BOTTERMAN et al., 1991; CTNBio, 2008; SODEK, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013).

A tecnologia Liberty Link<sup>®</sup> foi liberada pela CTNBio no ano de 2008. Plantas com esta tecnologia apresentam em seu DNA um gene que confere resistência à fosfinotricina (PPT), ou glufosinate, que é o ingrediente ativo do herbicida que atua como inibidor competitivo da enzima glutamina sintetase. Esse gene foi obtido a partir de isolados de duas espécies de bactérias homólogas *Streptomyces hygroscopicus* (*bar*) e *S. viridochromogenes* (*pat*) e, ambos os genes expressam a enzima Phosphinothricina Acetyl Transferase (PAT), que é utilizada como marcador na seleção de plantas transgênicas. Baixos níveis de atividade dessa enzima são necessários para conferir resistência ao herbicida nas culturas (THOMPSON et al., 1987; BOTTERMAN; LEEMANS, 1989; RASCHE, 1995; VASIL, 1996; WEHRMANN et al., 1996; OECD, 2002).

A enzima PAT metaboliza rapidamente o glufosinate em um composto estável e não tóxico para a planta, o ácido 2-acetamido-4-methylphosphinobutanoico (N-acetyl-L-glufosinate - NAG), que desintoxica a PPT e impede a morte da planta (acetilação de PPT em NAG) (Figura 6) (MULLNER et al., 1993).

Já a tecnologia WideStrike<sup>®</sup> foi liberada pela CTNBio em 2009 (CTNBio, 2009). O algodão com esta tecnologia é um evento transgênico que expressa em seu DNA duas proteínas com potencial inseticida do gênero *Bacillus thuringiensis*: a subespécie *aizawai* e a *krustaki*, Cry1F e Cry1Ac, respectivamente. As duas formas de proteínas apresentam o gene *pat* (STECKEL et al. 2012), que é utilizado como um gene marcador de seleção, para facilitar a determinação da presença dos genes Cry1F e Cry1Ac, o que também confere uma certa resistência ao herbicida amônio glufosinate (OECD, 2012; TAN et al., 2006).

No entanto, essa resistência ao herbicida amônio glufosinate não é equivalente às variedades Liberty Link<sup>®</sup>, pois a atividade da enzima é mais baixa (OECD, 2002; TAN et al., 2006). De uma a duas aplicações de amônio glufosinate podem ocasionar injúrias em cultivares de algodão na ordem 15-25% (BARNETT et al., 2011; CULPEPPER et al., 2009; DODDS et al., 2011; WHITAKER et al., 2011).

O algodão WideStrike® apresenta resistência a algumas pragas da ordem lepidóptera de importância para a cultura, como *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho do milho), *Spodoptera eridania* (lagarta das folhas), *Spodoptera exigua* (lagarta da batata doce), *Spodoptera cosmioides* (lagarta marrom) *Heliothis virescens* (lagarta da maçã), *Helicoverpa zea* (lagarta do milho) *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (falsa medideira), *Alabama argilacea* (curuquerê) (DOW CHEMICAL COMPANY, 2006).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Condução do Experimento

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NuPAM), pertencente ao Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas - FCA / UNESP - Campus de Botucatu (SP), durante os meses de julho a setembro de 2013. Dois experimentos foram conduzidos simultaneamente, um com o objetivo de avaliar o comportamento dos níveis de intoxicação e alterações na fotossíntese das plantas após a aplicação dos tratamentos e o outro com o objetivo de quantificar compostos relacionados a rota metabólica na qual atua o herbicida amônio glufosinate, como glutamato e serina (Figura 9).



Figura 9. Experimento conduzido em casa de vegetação no NuPAM. Botucatu/SP, 2014.

Cada unidade experimental, de ambos experimentos, foi composta por vasos plásticos com capacidade para 1 litro, os quais foram preenchidos com solo e substrato Bioplant (material orgânico de origem vegetal e vermiculita expandida), na proporção de 1:1. Realizou-se a análise química da mistura, que apresentou as seguintes características: pH  $\text{CaCl}_2$ : 4,8; Matéria orgânica:  $106 \text{ g dm}^{-3}$ ; P:  $223 \text{ mg dm}^{-3}$ ; Al:  $1 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; H + Al:  $43 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; K:  $4,6 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; Ca:  $98 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; Mg:  $26 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; Soma de bases:  $126 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; CTC:  $169 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; V%: 74. Afim de elevar o pH para melhor adequação de cultivo do algodão, que necessita de condições de solo com pH acima de 5, realizou-se calagem da mistura solo-substrato.

No dia 27 de julho de 2013 foram semeadas 5 sementes por vaso de três cultivares de algodão FM 993, FM 975WS e IMACD 6001LL e, aos 15 dias após a emergência (DAE) foi realizado o desbaste das plantas, mantendo duas plantas por vaso. A cultivar FM 993 é convencional e apresenta ciclo tardio (160 a 190 dias); a FM 975WS é transgênica e apresenta ciclo tardio (160 a 190 dias); a IMACD 6001LL é transgênica e apresenta ciclo intermediário (150 a 160 dias) (Vilela et al., 2012).

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), analisando três cultivares de algodão, com quatro doses do herbicida amônio glufosinate, com aplicações sequenciais do herbicida em três fases de desenvolvimento da cultura após a semeadura, com quatro repetições.

Os tratamentos dentro de cada cultivar foram divididos em função das doses aplicadas e dos períodos de aplicação. As doses calculadas para cada tratamento foram  $200 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ ,  $400 \text{ g i.a. ha}^{-1}$  e  $600 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ , cuja primeira dose corresponde a 100% da dose comercial recomendada ( $400 \text{ g i.a. ha}^{-1} / 2 \text{ L p.c. ha}^{-1}$ ) e a última dose corresponde a 200% da dose comercial recomendada do herbicida amônio glufosinate (Finale). Os períodos de aplicação de cada tratamento foram aos 25, 40 e 55 DAE (Tabela 1).

Quando as plantas de algodão apresentaram 2 folhas verdadeiras completamente emergidas, aos 25 DAE (Figura 10), foi realizada a primeira aplicação dos tratamentos e, aos 40 DAE e 55 DAE a segunda e terceira aplicações sequenciais, respectivamente. As coletas em todos os períodos foram realizadas aos 2 Dias Após a Aplicação (DAA) dos tratamentos, correspondendo aos 27 DAE, 42 DAE e 57 DAE.

Tabela 1. Tratamentos experimentais. Botucatu/SP, 2014.

Tratamento	Dose i.a. ha <sup>-1</sup>	Período de aplicação	Períodos de coleta
T 1.1	1 L (200 g i.a)	25 DAE	27 DAE
T 1.2	1 L (200 g i.a)	40 DAE	42 DAE
T 1.3	1 L (200 g i.a)	55 DAE	57 DAE
T 2.1	2 L (400 g i.a)	25 DAE	27 DAE
T 2.2	2 L (400 g i.a)	40 DAE	42 DAE
T 2.3	2 L (400 g i.a)	55 DAE	57 DAE
T 3.1	3 L (600 g i.a)	25 DAE	27 DAE
T 3.2	3 L (600 g i.a)	40 DAE	42 DAE
T 3.3	3 L (600 g i.a)	55 DAE	57 DAE
T 4.1	-----	25 DAE	27 DAE
T 4.2	-----	40 DAE	42 DAE
T 4.3	-----	55 DAE	57 DAE

L: Litro; i.a. – ingrediente ativo; DAE: Dias Após a Emergência.

A aplicação dos tratamentos foi realizada com o auxílio de um pulverizador estacionário instalado em ambiente fechado, em laboratório no NuPAM. O pulverizador é constituído de uma estrutura metálica, onde encontra-se acoplada uma estrutura móvel suspensa a 2,5 m de altura, constituída por um conjunto de motor elétrico e modulador de frequência que possibilita o controle da velocidade operacional da barra de pulverização. A barra de pulverização foi equipada com quatro pontas de pulverização de modelo XR Teejet 110.02 VS, espaçadas em 0,5 m e posicionadas a 0,5 m de altura em relação às plantas, deslocando por uma área útil de 4,5 m<sup>2</sup> no sentido do comprimento do equipamento (3 m de comprimento por 1,5 m de largura). O consumo de calda foi padronizado em 200 L ha<sup>-1</sup> a uma pressão constante de 1,5 bar e a velocidade operacional foi de 3,6 km h<sup>-1</sup>.

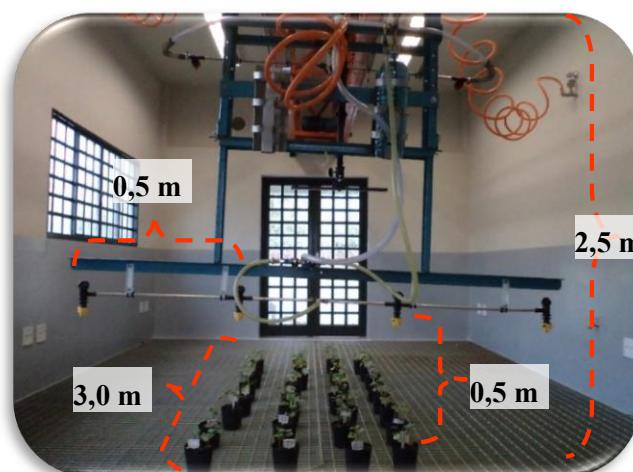


Figura 10. Pulverizador estacionário laboratório NuPAM. Botucatu/SP, 2014.

## 5.2 Extração e Quantificação de Amônia

A metodologia adotada para a extração de amônia foi a desenvolvida por Barberis (2012), que tem como objetivo recuperar toda a amônia da folha utilizando uma solução extratora ácida submetida ao processo de sonicação e, a análise para quantificação da amônia foi realizada segundo protocolo de Petersen e Hurle (2000), que utiliza colorimetria pela ação de reagentes e determinação via espectrometria.

As coletas das folhas das plantas de algodão foram realizadas dois dias após a aplicação (2 DAA) dos tratamentos, seguindo na seguinte ordem: identificação e pesagem de garrafas de poliestireno com capacidade de 300 mL (P1), pesagem das garrafas com as folhas de cada planta coletada (P2) e pesagem das garrafas com as folhas coletadas e completadas com água acidificada. Previamente realizou-se o preparo da água acidificada, adicionando-se em um recipiente de 20 L água *milli q* e ácido clorídrico (4N), sob agitação, de modo que o pH atingido fosse igual a 3,5. Ao obter a última pesagem, as garrafas foram colocadas em banho de ultrassom (sonicação) por 60 minutos. Após os 60 minutos, foram retiradas as garrafas do banho de ultrassom e o material vegetal de dentro de cada garrafa.

O método de quantificação da amônia foi realizado pelo seguinte protocolo: método colorimétrico com base em uso da amostra fresca onde utilizou-se o espectrofotômetro de duplo feixe modelo GBC/Cintra 40, operando no comprimento de onda de 630 nm. Foram adotados os seguintes procedimentos de preparo dos reagentes:

a) Hipoclorito de Sódio – foram adicionados 10 ml de hipoclorito (NaClO) 6% e 40 ml de água *milli q* em um béquer sob agitação e, adicionou-se ácido clorídrico (4N) com a finalidade de ajustar o pH da solução entre 6,0 e 7,0;

b) Sulfato Manganoso (0,05 Molar) – adicionou-se 0,05g de sulfato manganoso (MnSO<sub>4</sub>) em um balão volumétrico e completou com água *milli q* até atingir o volume de 100 mL;

c) Solução Fenol + Hidróxido de Sódio – adicionou-se 2,5 gramas hidróxido de sódio (NaOH) e 10g de fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C1) em um balão volumétrico de 100 ml, e completou com água *milli q*;

d) Solução estoque de sulfato de amônia (para obtenção da curva de calibração com os padrões) 0; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 2 e 3 ppm, que correspondem a adição de 50 µL; 100 µL, 250 µL, 500 µL, 750 µL, 1000 µL, 2000 µL e

3000  $\mu\text{L}$  da solução estoque de amônia com concentração de 100 ppm, em balões volumétricos com capacidade de 100 mL.

Para o preparo das amostras, seguiu-se a seguinte ordem de adição da solução extraída e reagentes para determinação colorimétrica: (1°) Pipetou-se 10 mL da solução de cada amostra em tubo de ensaio previamente identificado; (2°) adicionou-se uma gota de sulfato de manganês; (3°) pipetou-se 500  $\mu\text{L}$  de Hipoclorito de Sódio e (4°) pipetou-se 600  $\mu\text{L}$  da solução Fenol + NaOH. Manteve-se as amostras sob agitação por 10 minutos num agitador do tipo orbital. Após a agitação, realizou-se a leitura da absorbância das amostras (Figura 11).



Figura 11. Sequência dos processos de extração e determinação de amônia: pesagens (garrafa, garrafa + matéria fresca da amostra, garrafa + matéria fresca da amostra + água acidificada), preenchimento com a água previamente acidificada, sonicação em banho de ultrassom, retirada das folhas após a sonicação, pipetagem das amostras e reagentes, agitação, e determinação em espectrofotômetro. Botucatu/SP, 2014.

A partir dos dados de absorvância e concentração conhecida da curva padrão, ajustou-se uma equação e, então a partir dessa equação e dos dados de absorvância das amostras, obteve-se a concentração de cada amostra. Com a concentração de cada amostra, volume de água adicionado e massa fresca da amostra, calculou-se a massa de amônia em relação a massa de matéria fresca da amostra.

### 5.3 Extração e Determinação do Glufosinate, Glutamato e Serina

Para a extração dos compostos, foi adotada a metodologia desenvolvida por Barberis (2012). Aos dois dias após a aplicação dos tratamentos, no mesmo dia da determinação de amônia, separou-se uma alíquota de aproximadamente 200 mg de folhas de algodão, que foram acondicionadas em sacos plásticos e posteriormente armazenadas em freezer a -80°C.

Na ocasião de determinação dos compostos, macerou-se as amostras com nitrogênio líquido, utilizando graal e pistilo. Pesou-se uma alíquota de 200 mg de cada amostra macerada, acondicionando-as em tubos falcon de 15 mL e adicionou-se 10 mL da solução extratora 75% água: 25% metanol. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Após centrifugação por 4.000 g por 5 minutos, realizou-se a filtração do sobrenadante das amostras com filtros Millipore 0,2 µm, transferindo o conteúdo para *vials* e levando-as para análise em LC/MS/MS (Figura 12).

Os compostos determinados por esta metodologia foram: glutamato, serina, glufosinate. Para esta determinação foi utilizado um sistema LC-MS/MS, composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, que combina análise ultra-rápida e excelente performance de separação, com alta confiabilidade de resultados; equipado com duas bombas LC-20AD, autoinjeter SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 3200 Q TRAP (Applied Biosystems) híbrido triplo quadrupolo, onde Q1 e Q3 são utilizados como filtros de massa e Q2 é uma célula de colisão onde as moléculas intactas e fragmentos de Q1 são quebrados em fragmentos de massas menores (QUEIROGA, 2009).

A cromatografia líquida (HPLC) é uma ferramenta utilizada na técnica de espectrometria de massas (MS) responsável pela separação, em fase líquida,

de misturas complexas, sendo utilizada como um sistema de inserção de compostos. As amostras foram inseridas no equipamento, cuja fase móvel utilizada foi água e metanol (proporção de 75% e 25%, respectivamente), adicionados de 5mM de acetato de amônio. Após a introdução da amostra no sistema, estas passaram pelo sistema de ionização Electrospray (ESI), que é a fonte mais comumente utilizada para o acoplamento LC-MS, onde são geradas pequenas gotas (fase móvel + íons carregados). No local de formação das pequenas gotas foi aplicado como gás de solvatação o N<sub>2</sub>, que tem a função de eliminar as moléculas do solvente (fase móvel), diminuindo ainda mais as gotas formadas. Assim, as gotas seguiram para o sistema analisador, que no caso foi o triplo quadrupolo, onde o primeiro quadrupolo selecionou somente os íons de interesse (Q1), passando pela câmara de colisão (onde ocorre a fragmentação dos íons) (Q2), seguindo para o segundo analisador que seleciona os fragmentos de acordo com suas massas (Q3), atingindo então o detector. O sistema dos quadrupolos e detector devem ser mantidos em um alto vácuo, em torno de 10<sup>-5</sup>-10<sup>-8</sup> mbar (IGLESIAS, 2012).

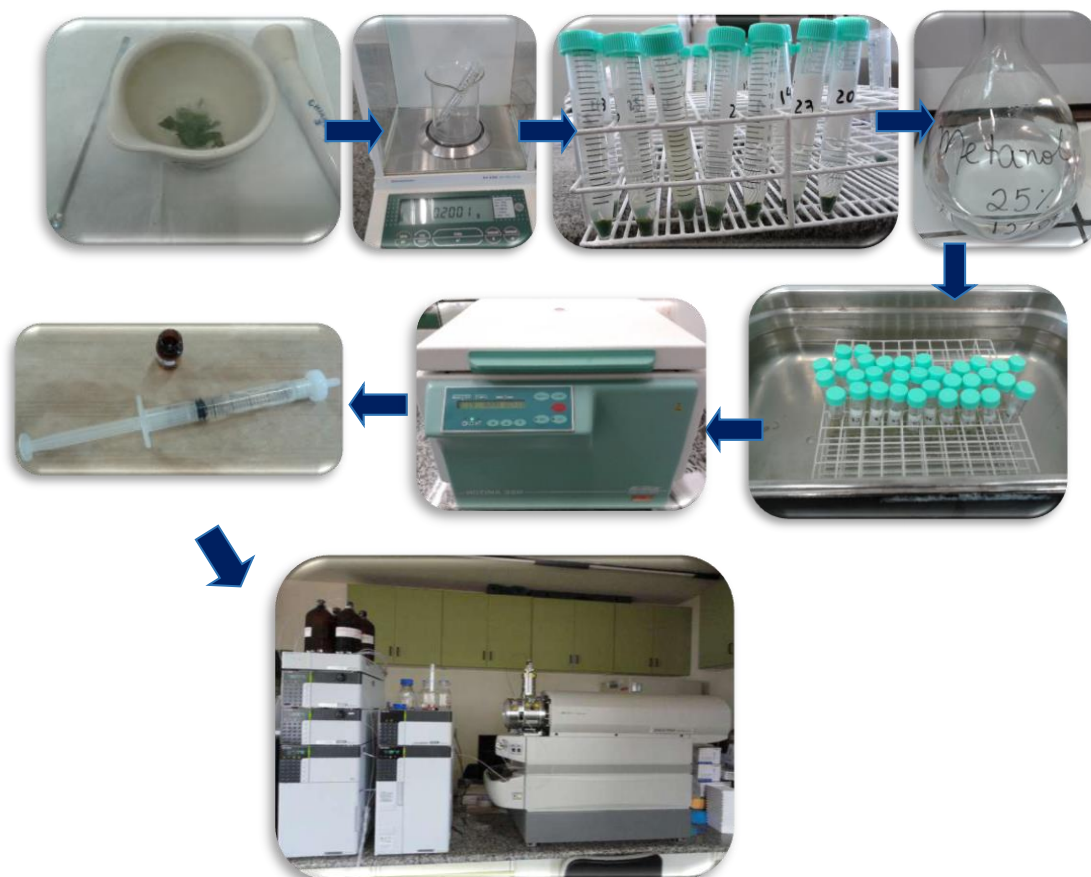


Figura 12. Sequência do protocolo de extração e determinação dos compostos: maceração das folhas com nitrogênio líquido, pesagem, acondicionamento em tubos falcon com capacidade para 15 mL, adição da solução extratora metanol: água, banho de ultrassom, centrifugação e determinação em cromatografia líquida. Botucatu/SP, 2014.

A massa molecular e os fragmentos gerados a partir de cada molécula estão apresentados na Tabela 2. O fragmento utilizado para quantificação de cada um dos compostos foi sempre o primeiro apresentado na Tabela 2, para cada composto. A detecção e separação dos compostos foram realizadas em uma corrida e os tempos de retenção dos compostos retidos pela coluna cromatográfica foram: glutamato (1,29 min), glufosinate (1,28 min) e serina (1,47 min). As Figuras 13, 14 e 15 representam os cromatogramas do padrão analítico do composto glutamato, glufosinate e serina.

Tabela 2. Massa molecular e íons secundários dos compostos analisados. Botucatu/SP, 2014.

Compostos	Massa Molecular (Da)	Íons Secundários (Fragmentos)
Glutamato	148,141	84,1 130,1 56,1
Glufosinate	182,146	136,0 56,0 119,2
Serina	106,034	60,1 88,2 69,9

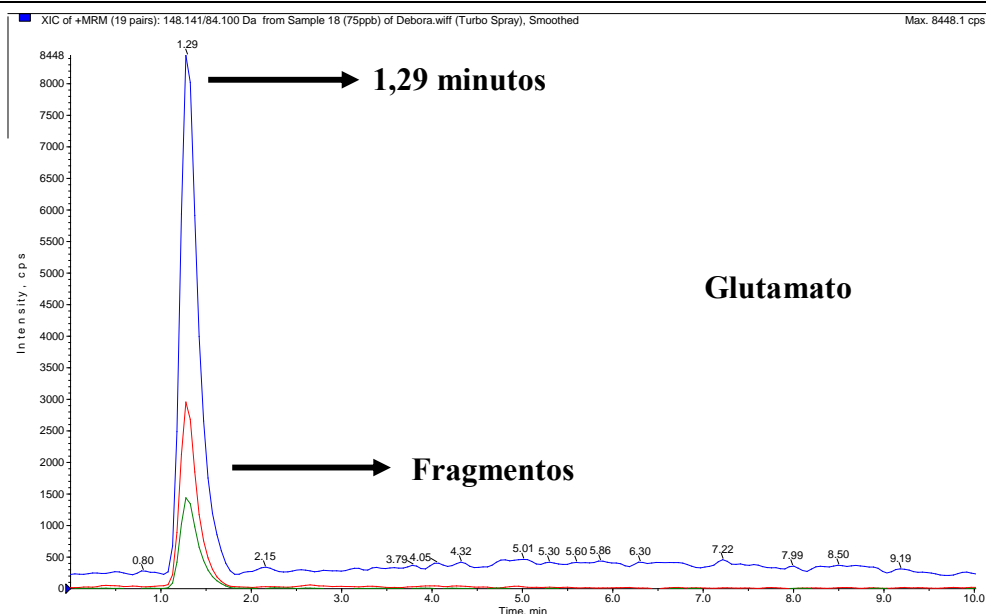


Figura 13. Cromatograma do glutamato com os respectivos fragmentos na concentração de 200 ng ml<sup>-1</sup>. Botucatu/SP, 2014.

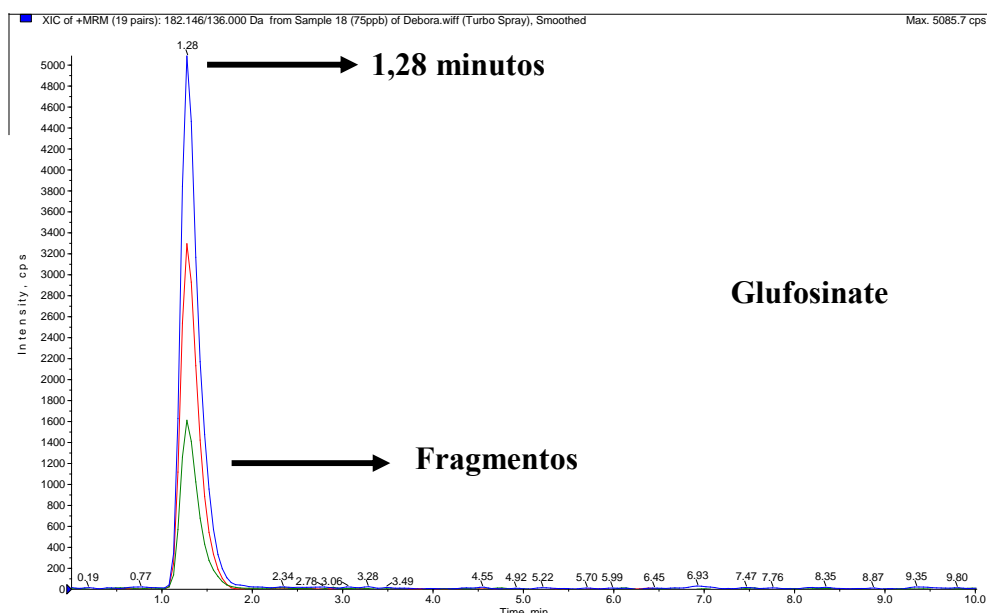


Figura 14. Cromatograma do glufosinate com os respectivos fragmentos na concentração de 200 ng ml<sup>-1</sup>. Botucatu/SP, 2014.

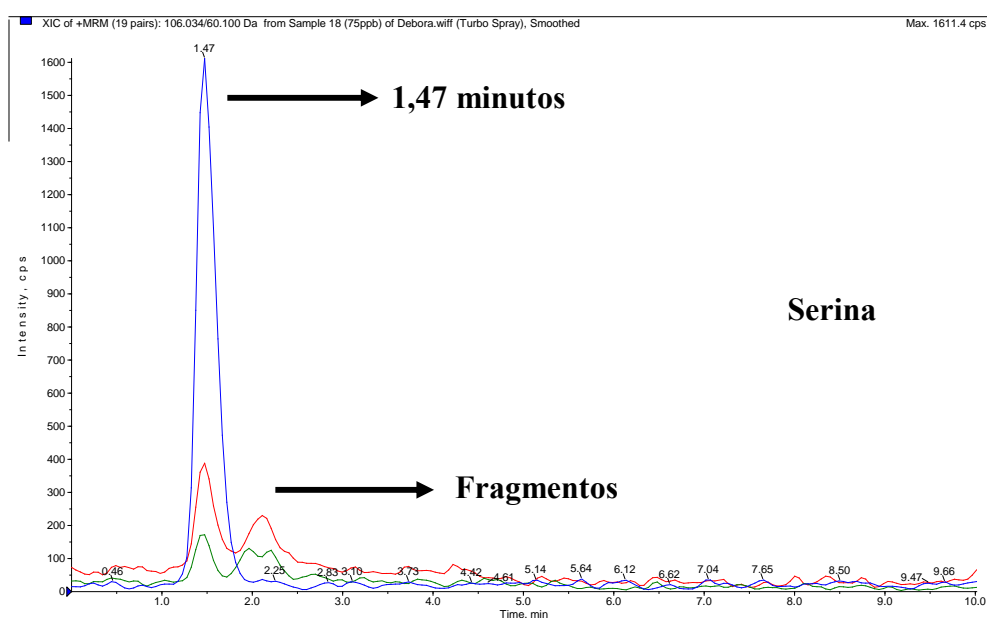


Figura 15. Cromatograma do glufosinate com os respectivos fragmentos na concentração de 200 ng ml<sup>-1</sup>. Botucatu/SP, 2014.

A quantidade do analito na amostra é determinada a partir das áreas cromatográficas, a partir de uma curva analítica, que é a relação entre a área e a quantidade do analito. Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do analito em estudo (GONÇALVES, 2007). A linearidade do método pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta  $y = ax + b$ ,

onde b é a intersecção da curva analítica e a é a inclinação da reta, que deve também ter um alto coeficiente de correlação ( $r > 0,9999$ ) (ARAGÃO et al., 2009). As curvas analíticas para os compostos foram construídas nas faixas de concentração descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Curvas analíticas e faixas de concentração para cada composto analisado. Botucatu/SP, 2014.

<b>Composto</b>	<b>Equação da reta (<math>y = ax + b</math>)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>Intervalo linear (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>
Glutamato	$y = 1,63.10^3x + 70,3$	0,9994	2.4 – 300
Glufosinate	$y = 1,01. 10^3x + (- 438)$	0,9994	2.4 - 600
Serina	$y = 264x + 1,04.10^3$	0,9966	2.4 - 600

#### 5.4 Avaliações de Fluxo de Transporte de Elétrons e Fitotoxicidade

As avaliações do fluxo de transporte de elétrons foram realizadas aos 0, 1, 2, 5, 8 dias após a aplicação (DAA) da cultivar FM 993 e, até os 15, 17 e 22 DAA das cultivares FM 975WS e IMACD 6001LL. Para estas avaliações utilizou-se um fluorômetro portátil (Figura 16) (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS 5p – Opti Sciences), com cinco repetições de leituras por planta tratada, adotando-se o protocolo Yield para as medições, cujo modelo quantifica a fluorescência que a planta emite.

A taxa de transporte de elétrons é obtida através da medida da fluorescência das clorofilas do PS II, porém é uma medida variante e influenciada pelas condições fisiológicas da planta, podendo ser utilizada como técnica de monitoramento da fixação de carbono na fotossíntese e, assim detectar injúrias ainda não visuais nas plantas tratadas com herbicida. A eficiência fotossintética das plantas diminui de acordo com o tamanho e severidade do dano sofrido após a aplicação do herbicida. Em função do tipo de dano ocasionado nas plantas, pode haver recuperação destas (em horas ou dias) ou mesmo a morte (parcial da área tratada ou total da planta) (ARALDI, 2010).

O cálculo da porcentagem do valor da taxa de transporte [ETR(%)] de elétrons considerou os valores obtidos nas plantas sem tratamento 100% e os valores das plantas tratadas em função dos valores da testemunha, como na fórmula abaixo:

$$ETR (\%) = \text{valor ETR planta tratada} * 100 / \text{valor ETR planta testemunha}$$



Figura 16. Modelo do equipamento fluorômetro portátil utilizado. Botucatu/SP, 2013. (SILVA, 2012).

As avaliações de fitointoxicação foram realizadas aos 0, 2, 3, 5, 8, 15, 22, 29 DAA para a cultivar FM 993 e até os 36 e 43 DAA para as cultivares FM 975WS e IMACD 6001LL, com base em notas visuais de 0 a 100 (onde 0 determinou plantas saudias e 100 determinou 100% das plantas mortas), de acordo com a metodologia da SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS (SBCPD, 1995).

### 5.5 Análises dos Dados

Para os resultados dos teores de amônia, glutamato, glufosinate e serina ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), intoxicação das plantas e taxa de transporte de elétrons (ETR) nos diferentes períodos, foi estabelecido o erro padrão dos dados, em que foi determinado adotando-se a seguinte equação:

$$EP = \frac{\text{desvpad}}{\sqrt{nr}}$$

onde,

EP - Erro padrão;

desvpad - Desvio padrão;

$\sqrt{nr}$  - raiz quadrada do número de repetições.

Os dados de amônia, glutamato, glufosinate e serina foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico SISVAR.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Fitotoxicidade

A fitotoxicidade ocasionada pelo herbicida amônio glufosinate em três cultivares de algodão em função dos dias após a primeira aplicação pode ser observada na Figura 17 [A, B e C].

Após a aplicação dos tratamentos houve aumento nos sintomas visuais nas plantas de algodão da cultivar FM 993 (Figura 17 A), até atingir a morte total, aos 29 DAA para as doses de 2 e 3 L ha<sup>-1</sup>. A dose de 3 L ha<sup>-1</sup> proporcionou a máxima fitointoxicação de 93% aos 22 DAA. Steckel et al. (2012) também observaram sintomas de toxicidade em plantas de algodão tratadas com o herbicida amônio glufosinate. Barberis et al (2012) observou aumento da intoxicação de plantas de soja convencional na medida que se aumentou as doses dos tratamentos com o mesmo herbicida.

Os sintomas visuais de fitotoxicidade observados na cultivar IMACD 6001LL (Figura 17 B) apresentaram maior severidade (15%) aos 36 DAA na dose de 3 L ha<sup>-1</sup>. As plantas tratadas com a dose de 1 L ha<sup>-1</sup> apresentaram os primeiros

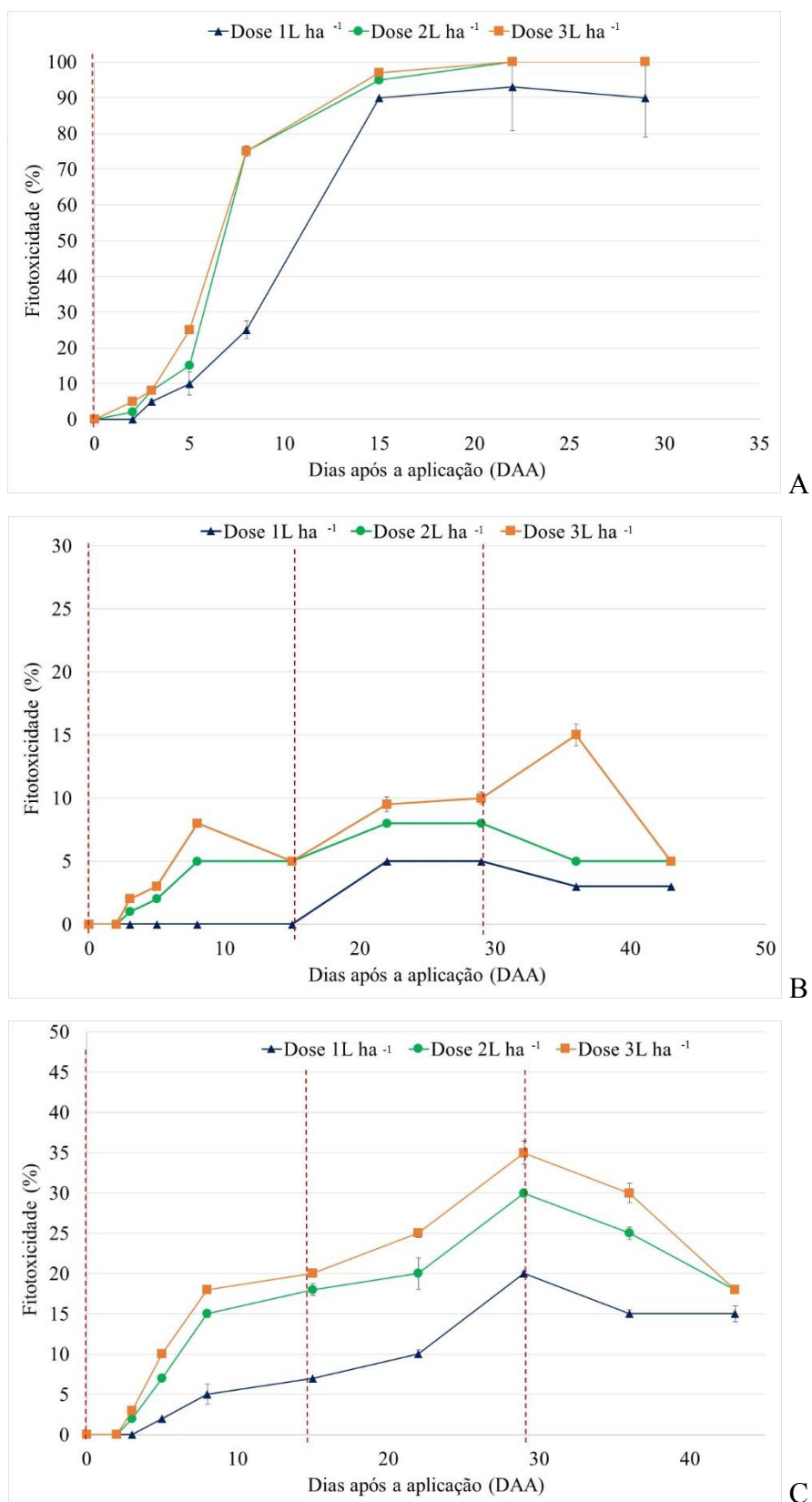


Figura 17. Fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre as cultivares: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL e [C] FM 975WS em função dos dias após a aplicação do herbicida. --- Representa o momento da aplicação. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014.

sintomas de fitotoxicidade somente após a segunda aplicação do herbicida amônio glufosinate. De maneira geral, após a aplicação dos tratamentos as plantas apresentaram certo grau de intoxicação e, ao decorrer dos períodos de avaliação ocorreu uma redução desta intoxicação para todos os tratamentos avaliados.

Quanto a cultivar FM 975WS (Figura 17 C), observa-se para todos os tratamentos aos 3 DAA sintomas visuais de fitotoxicidade, cuja maior severidade, de 35% é atingida aos 29 DAA na dose de 3 L ha<sup>-1</sup>. As plantas tratadas com a dose de 1 L ha<sup>-1</sup> apresentaram os menores sintomas de fitotoxicidade, atingindo a máxima intoxicação de 20% aos 29 DAA. De maneira geral, após a aplicação dos tratamentos as plantas apresentaram certo grau de intoxicação e, ao decorrer dos dias ocorreu uma redução deste efeito em todos os tratamentos. Em alguns estudos realizados, observou-se aumento nas injúrias ocasionadas a partir de duas aplicações do herbicida amônio glufosinate, em plantas de algodão WS (BARNETT et al. 2011; CULPEPPER et al. 2009; DODDS et al. 2011; WHITAKER et al. 2011).

## 6.2 Taxa de Transporte de Elétrons

Encontra-se representada na Figura 18 as taxas do transporte de elétrons do fotossistema II (PS II) em folhas maduras de algodão das cultivares FM 993 [A], IMACD 6001LL [B] e FM 975WS [C], respectivamente.

A cultivar FM 993 no segundo dia após a aplicação do herbicida apresentou queda acentuada, de 85%, em sua taxa de transporte de elétrons no tratamento com a dose de 3L ha<sup>-1</sup>, chegando a 95% no último período de avaliação (Figura 18 A). De maneira geral, pode-se observar que as doses apresentaram um comportamento semelhante ao longo dos períodos de avaliação, não demonstram indícios de recuperação após a aplicação dos tratamentos. Ziegler e Wild (1989) também observaram uma queda na taxa de transporte de elétrons em folhas de mostarda branca tratadas com o herbicida glufosinate, assim como Wild et al. (1987) e Sauer et al. (1987) também em mostarda branca, Silva (2012) com algodão e Barberis (2012) com soja.

A cultivar IMACD 6001LL (Figura 18 B) apresentou redução máxima de 18% em sua taxa de transporte de elétrons no tratamento com a dose de 3 L ha<sup>-1</sup> no último período de avaliação (aos 22 DAA), em relação a testemunha. Por as plantas apresentarem um teor de amônia mais baixo e ativa atividade da enzima GS, os

níveis de glioxilato também são mantidos baixo, mantendo ativa a atividade da enzima RUBISCO e, portanto, a atividade fotossintética das plantas foi pouco reduzida após o tratamento com o herbicida amônio glufosinate (STEPHENSON et al., 2006).

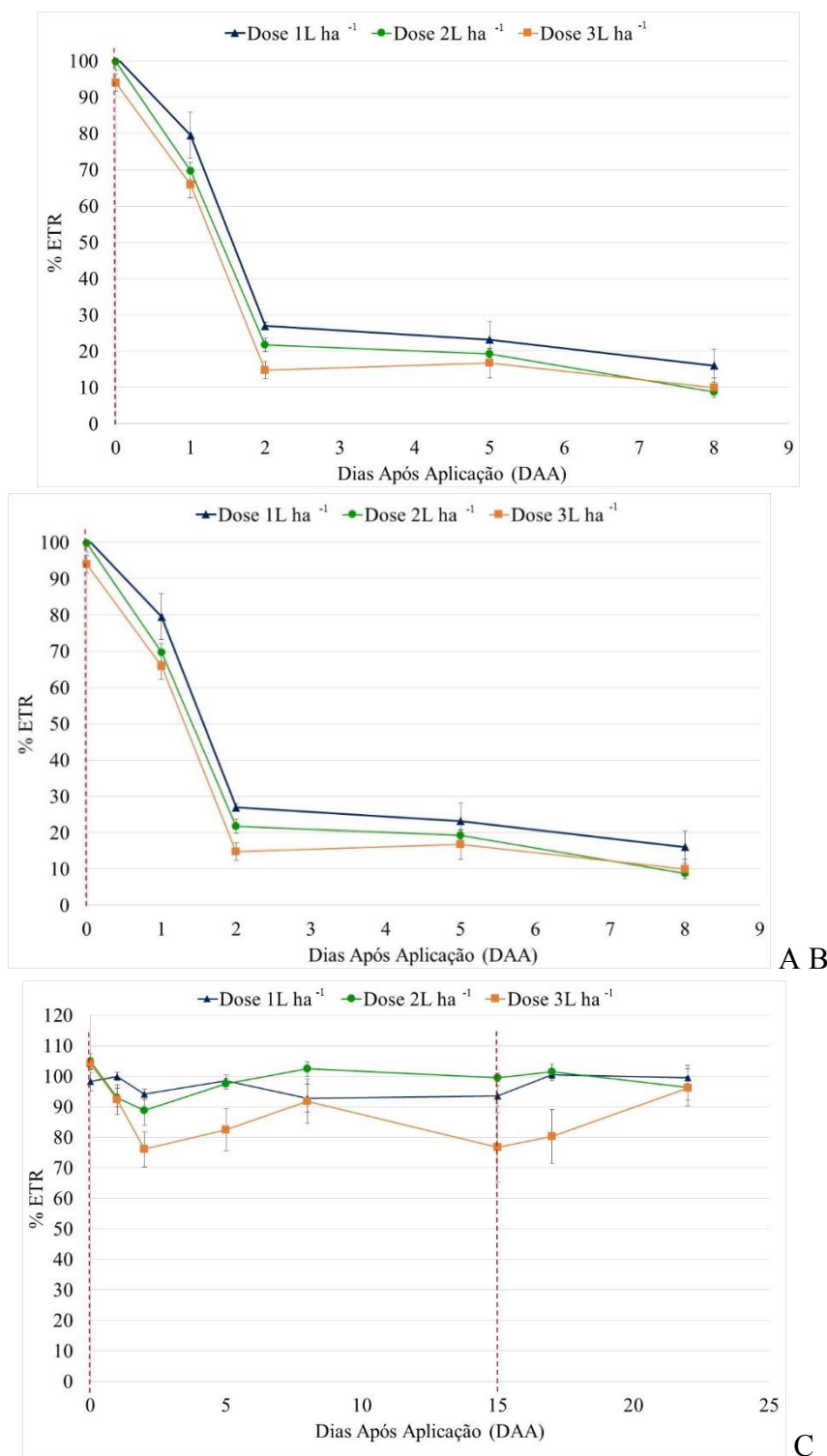


Figura 18. Taxa de transporte de elétrons em função dos dias após a aplicação do herbicida amônio glufosinate sobre as cultivares: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL E [C] FM 975WS. --- Representa o momento da aplicação. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014.

O comportamento da taxa de transporte de elétrons da cultivar FM 975WS (Figura 18 C) foi intermediário em comparação com as outras duas cultivares, ou seja, após a aplicação dos tratamentos houve uma maior severidade sobre a atividade fotossintética das plantas em relação à cultivar IMACD 6001LL, porém não tão elevada ao ponto de ocasionar a morte das plantas como na cultivar FM 993. A máxima redução ocasionada pelo herbicida sobre as plantas foi de 24% aos 2 DAA na dose de 3 L ha<sup>-1</sup> e, apresentando aos 8 DAA uma atividade fotossintética superior à testemunha na dose de 2 L ha<sup>-1</sup>.

### 6.3 Teor de Amônia

Na Figura 19 (A, B e C) estão representados os valores do teor de amônia das cultivares FM 993, IMACD 6001LL e FM 975WS, respectivamente, após os três períodos de coleta, que correspondem aos 27, 42 e 57 dias após a emergência da cultura (DAE) em função das doses aplicadas em cada tratamento.

A cultivar FM 993 (Figura 19 A) apresenta os teores de amônia aumentados à medida que se elevaram as doses do herbicida amônio glufosinate (16,92; 68,99; 79,33 e 166,35 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente às doses de 0, 1, 2 e 3 L ha<sup>-1</sup>). Por se tratar de uma cultivar suscetível ao herbicida amônio glufosinate, as plantas não possuem mecanismo de desintoxicação do glufosinate e/ou de elevados níveis de amônia produzidos a partir da aplicação do herbicida. Assim como pode ser observado na Figura 7, ao realizar a aplicação do herbicida amônio glufosinate ocorre a inibição da atividade da enzima glutamina sintetase (GS), que é enzima chave no processo de desintoxicação de amônia no interior das plantas e, ao interromper a atividade da GS ocorre, portanto, acúmulo de amônia no interior das plantas.

Embora tenha sido pequena a diferença significativa entre os tratamentos de 1 L ha<sup>-1</sup> e 2 L ha<sup>-1</sup> (69 mg kg<sup>-1</sup> e 79 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente), essa diferença foi suficiente para ocasionar a morte das plantas tratadas com a maior dose. Wild et al. (1987) observaram aumento no teor de amônia em plantas de *Sinapis alba* tratadas com glufosinate comparado a plantas não tratadas, assim como Wendler et al (1989) em *Sinapis alba* e *Zea mays*, Mersey et al. (1990) em *Setaria viridis* e *Hordeum vulgare*, Sellers et al. (2004) em *Abutilon theophrasti*, Manderscheid et al. (2005) em *Chenopodium album*, *Solanum nigrum*, *Tripleurospermum inodorum* e *Echinochloa crus-*

*galli*, Tsai et al (2006) em *oryza sativa*, Barberis (2012) em *Glycine max* e Silva (2012) em *Gossypium hirsutum* L., *Ipomoea grandifolia* e *Brachiaria decumbens*.

Plantas de algodão da cultivar IMACD 6001LL (Figura 19 B) apresentaram teores de amônia inferiores aos da cultivar FM 993, pois expressam em seu DNA um gene que lhes conferem a atividade de uma enzima que metaboliza o glufosinate num composto não tóxico e que não compete com o sítio de ligação da enzima GS. O gene *pat* e/ou *bar* confere às plantas com a tecnologia Liberty Link<sup>®</sup> a atividade da enzima PAT que promove a acetilação do glufosinate, resultando em um menor acúmulo de amônia no interior das plantas (MANDERSCHIED; WILD, 1986; BOTTERMAN et al., 1991; CTNBio, 2008; SODEK, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Aos 57 DAA tanto a cultivar IMACD 6001LL (Figura 19 B) quanto a FM 975WS (Figura 19 C) apresentaram redução no teor de amônia comparados aos dois períodos avaliados anteriormente, o que pode ser uma resposta à metabolização desta amônia pela planta a partir ou somente neste período de avaliação.

É o que pode ser observado de maneira geral nos diferentes períodos de coleta, que dependendo do volume de aplicação do herbicida, o teor de amônia da testemunha pode até ser superior ao de plantas tratadas, comprovando que as plantas desta cultivar conseguiram metabolizar o glufosinate e ainda reduzir o teor de amônia em seu interior.

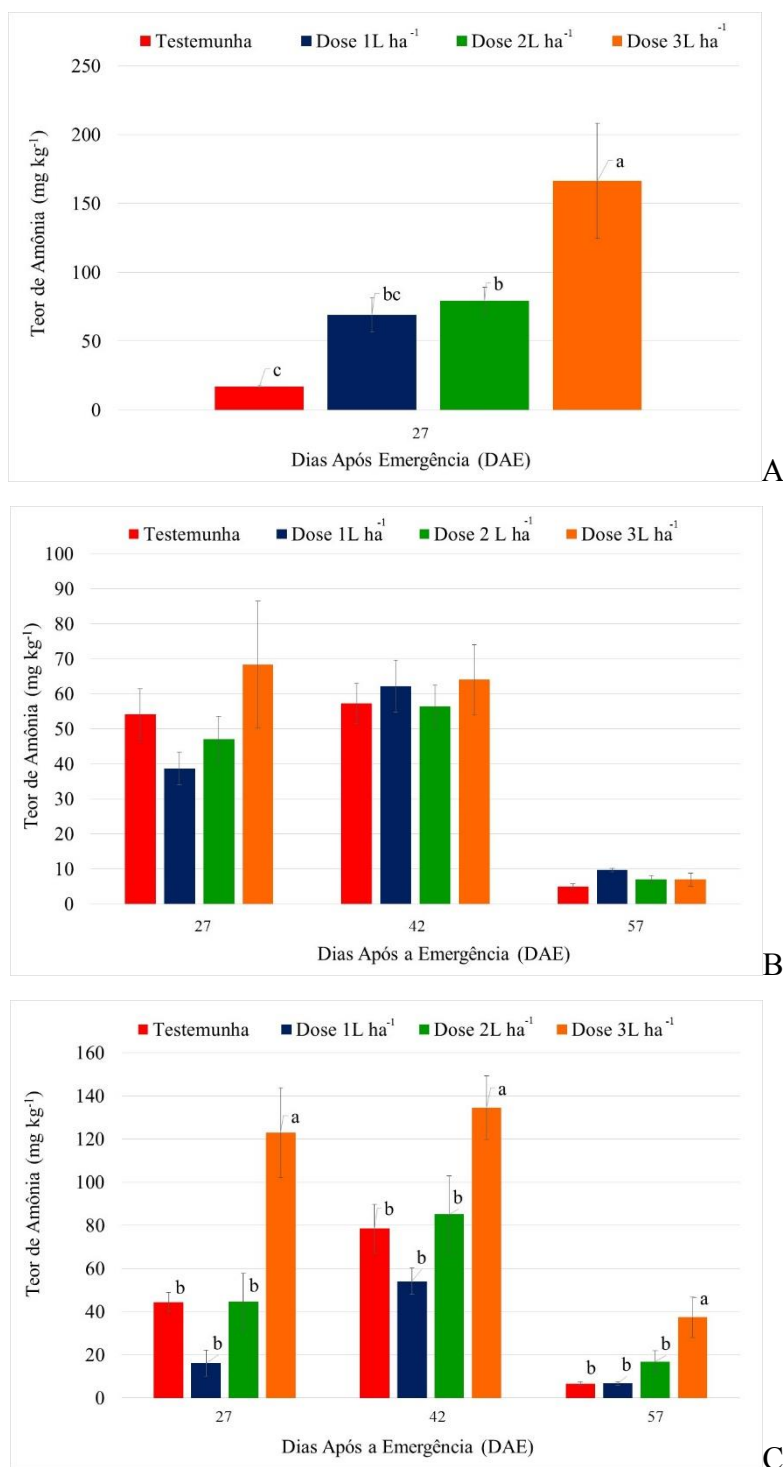


Figura 19. Teor de amônia (mg de amônia por kg de massa de matéria fresca) das cultivares de algodão: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL e [C] FM 975WS em função de quatro doses (L) do herbicida amônio glufosinate. Médias dos tratamentos agrupadas por DAE seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014.

## **6.4 Teor dos compostos do metabolismo do herbicida amônio glufosinate em plantas de algodão**

### **6.4.1 Glutamato**

Os resultados obtidos do teor de glutamato nas três cultivares de algodão podem ser observados na Figura 20 (A, B e C). Observa-se na Figura 20 A incremento do teor de glutamato em relação à testemunha, com o aumento das doses do herbicida para a cultivar suscetível. A cultivar FM 993 é convencional e ao submetê-la aos tratamentos com o herbicida amônio glufosinate, ocorre inibição da formação de glutamina e acúmulo de glutamato devido a inativação da enzima responsável por esta reação.

De acordo com a Figura 7, pode-se observar que ao realizar a aplicação do herbicida amônio glufosinate, ele atua como um análogo estrutural do glutamato, ligando-se a enzima GS, inibindo-a e promovendo redução da síntese de glutamina, acumulando portanto glutamato (SODEK, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013). Um efeito no aumento do teor de glutamato em plantas tratadas com amônio glufosinate também foi observado por Barberis (2012).

Quanto a cultivar IMACD 6001LL, pode-se observar na Figura 20 B quando comparado a testemunha, ocorreu pouca redução ou equivalência do teor de glutamato nos três períodos avaliados, com exceção ao segundo período de coleta na maior dose. A maior dose do herbicida aos 42 DAE propiciou uma certa intoxicação às plantas, observando-se aumento no teor de glutamato, que pode estar relacionado a uma fase mais sensível da planta a doses superiores a recomendada ( $2 \text{ L ha}^{-1}$ ).

O teor de glutamato da cultivar FM 975WS pode ser observado na Figura 20 C. As plantas de algodão da cultivar FM 975WS mesmo sem a aplicação dos tratamentos apresentaram teores de glutamato inferiores aos da cultivar IMACD 6001LL. A dose de  $1 \text{ L ha}^{-1}$  proporcionou às plantas de algodão maior teor de glutamato nos três períodos avaliados, sendo aos 57 DAE o maior acúmulo deste aminoácido.

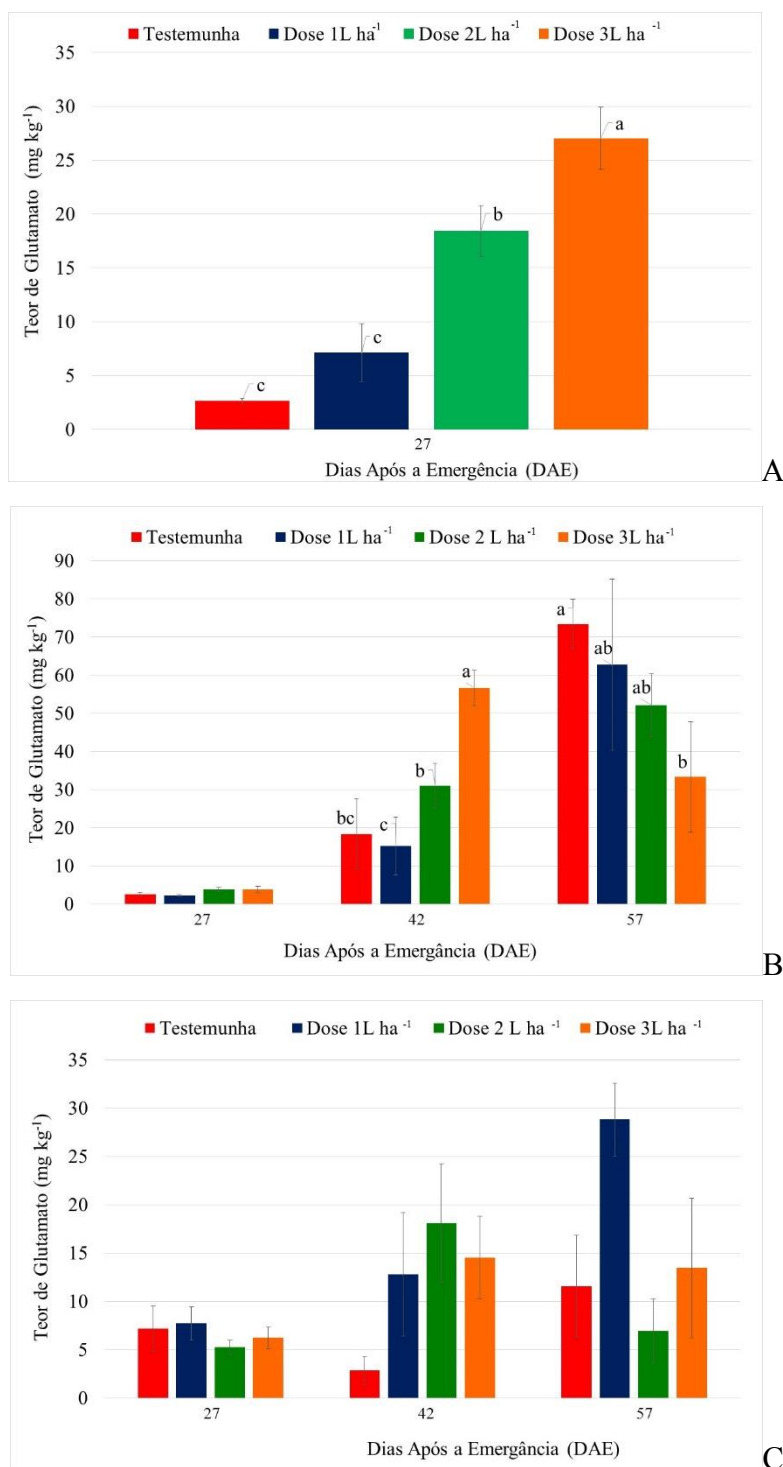


Figura 20. Teor de glutamato (mg de glutamato por kg de massa de matéria fresca) das cultivares de algodão: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL e [C] FM 975WS em função de quatro doses (L) do herbicida amônio glufosinate. Médias dos tratamentos agrupadas por DAE seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014.

#### 6.4.2 Glufosinate

A Figura 21 A, B e C representa os teores de glufosinate em três cultivares de algodão: FM 993, IMACD 6001LL e FM 975WS. Na Figura 21 A observa-se incremento no teor de glufosinate à medida que aumenta a dose do herbicida amônio glufosinate. A cultivar FM 993 por ser convencional, não apresenta mecanismos de metabolização da molécula ingrediente ativo do herbicida amônio glufosinate, portanto, quanto maior a dose da aplicação, maior será o teor no interior das plantas. Aumento no teor de glufosinate em plantas de soja após o tratamento o herbicida amônio glufosinate também foi observado por Barberis (2012).

Aos 27 e 42 DAE não se observa diferença significativa nas doses de 1 e 2 L ha<sup>-1</sup> (Figura 21 B) para a cultivar IMACD 6001LL. Maior teor de glufosinate pode ser observado em plantas tratadas com a dose de 3 L ha<sup>-1</sup> do herbicida amônio glufosinate, nos três períodos avaliados, sendo o maior teor (69,99 mg kg<sup>-1</sup>) ocorrido aos 42 DAE. O teor de glufosinate da cultivar FM 975WS pode ser observado na Figura 21 C.

As plantas resistentes a determinadas moléculas apresentam uma dose limite de resistência ao herbicida, sendo de 2 L ha<sup>-1</sup> (400 g i.a ) de amônio glufosinate para cultura do algodão. As doses superiores a recomendada podem ocasionar injúrias às plantas, pois estas não apresentam mecanismos suficientes para metabolização do excesso de herbicida.

Observa-se a manutenção do baixo teor de glufosinate nas doses de 1 L e 2 L ha<sup>-1</sup> devido à metabolização da molécula glufosinate, como observado na Figura 6, em que o gene *pat/bar* presente em plantas transgênicas ativa a enzima PAT, que metaboliza a reação de glufosinate em NAG - cultivares IMACD 6001LL e FM 975WS.

Assim como pode ser observado redução no teor de amônia aos 57 DAE para as cultivares FM 975WS e IMACD 6001LL, observa-se redução no teor de glufosinate no mesmo período avaliado para as mesmas cultivares. Podendo-se ressaltar a explicação de que este é um comportamento genético do material, que apresenta este ou a partir deste período sensibilidade à molécula do herbicida.

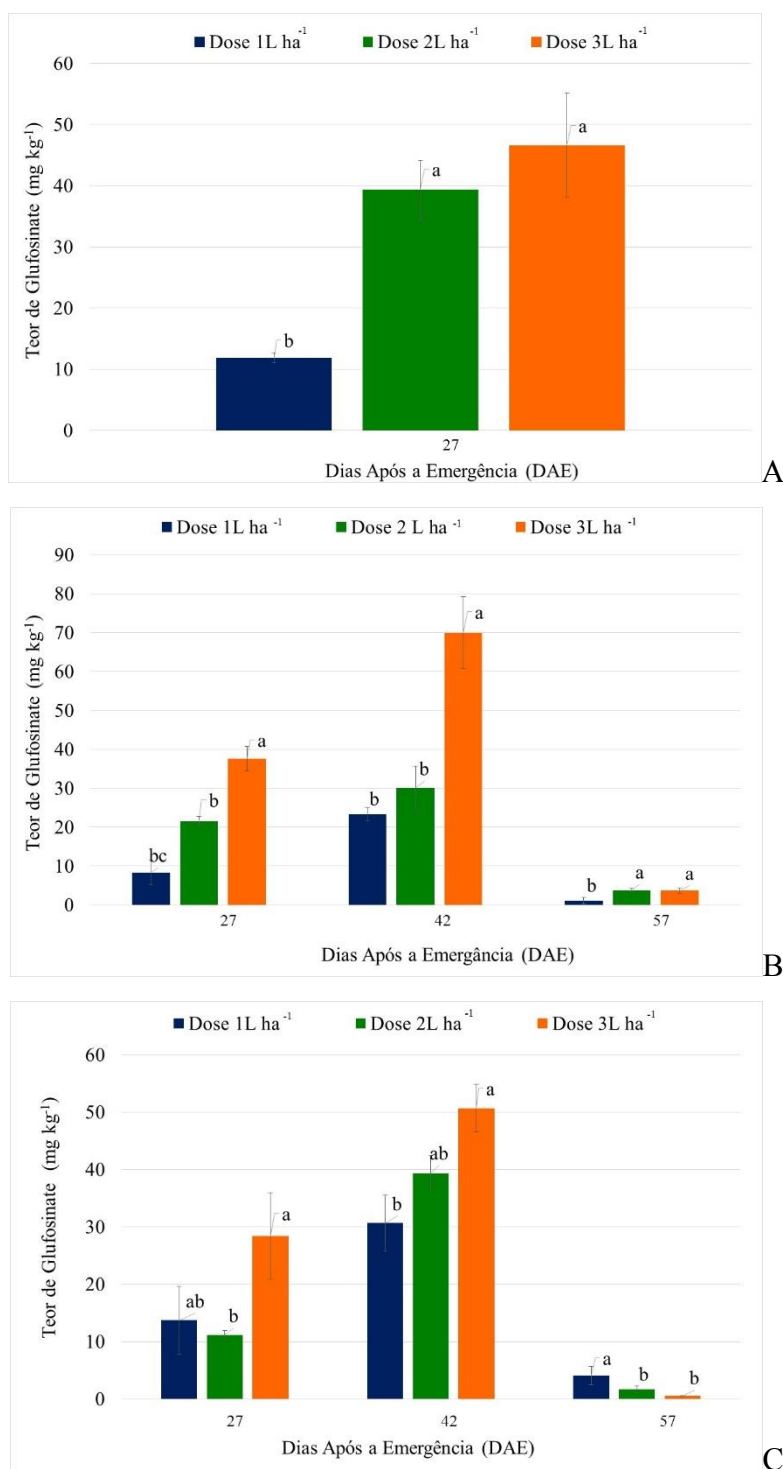


Figura 21. Teor de glufosinate (mg de glufosinate por kg de massa de matéria fresca) das cultivares de algodão: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL e [C] FM 975WS em função de quatro doses (L) do herbicida amônio glufosinate. Médias dos tratamentos agrupadas por DAE seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014.

### 6.4.3 Serina

Os teores de serina nas cultivares de algodão FM 993, IMACD 6001LL e FM 975WS podem ser observados na Figura 22 A, B e C, respectivamente. Na Figura 22 A não se observa tendência de aumento ou redução no teor de serina de acordo com o tratamento aplicado aos 27 DAE. Para a cultivar FM 993 a dose de 1 L ha<sup>-1</sup> propiciou o maior incremento deste aminoácido (30,48 mg kg<sup>-1</sup>), seguido da dose de 3L ha<sup>-1</sup> e 2 L ha<sup>-1</sup>, com respectivamente 28,20 e 21,79 mg kg<sup>-1</sup>. Aumento no teor de serina em plantas suscetíveis ao herbicida amônio glufosinate também foi observada por Barberis (2012).

Como pode ser observado na Figura 2, a serina é formada nas mitocôndrias a partir de outro aminoácido, a glicina, que é originada a partir do glioxilato, originado da atividade oxigenase da enzima Rubisco. O desbalanço na atividade de qualquer um desses aminoácidos envolvidos, ou mesmo do glutamato, que também pode ser catalisado pela mesma enzima de formação da glicina (GGAT), desbalança a formação e atividade da serina. Barberis (2012) trabalhando com plantas de soja, também observou maior nível de serina em doses menores do herbicida.

Na Figura 22 B pode-se observar o teor de serina na cultivar IMACD 6001LL. De maneira geral, ocorreu um incremento nos teores de serina após a aplicação a dos tratamentos com o herbicida amônio glufosinate, sendo a dose comercial de 2 L ha<sup>-1</sup> que promoveu maior incremento de serina (29,89 mg kg<sup>-1</sup>) aos 27 DAE. Quanto a cultivar FM 975WS, representada na Figura 22 C, não apresentou uma tendência no comportamento entre as doses nos períodos avaliados e, o maior incremento de serina (19,28 mg kg<sup>-1</sup>) pode ser observado aos 42 DAE na dose de 1 L ha<sup>-1</sup>.

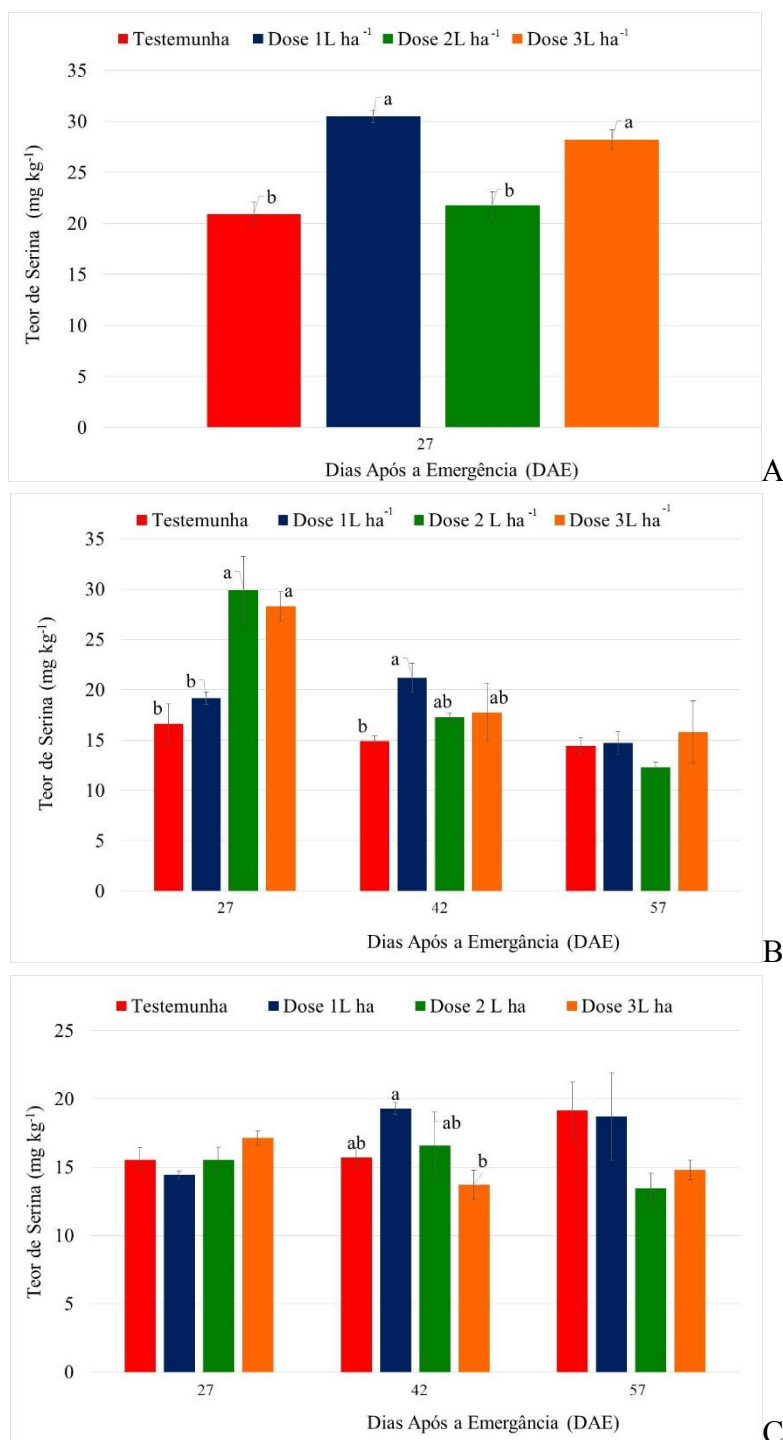


Figura 22. Teor de serina (mg de serina por kg de massa de matéria fresca) das cultivares de algodão: [A] FM 993, [B] IMACD 6001LL e [C] FM 975WS em função de quatro doses (L) do herbicida amônio glufosinate. Médias dos tratamentos agrupadas por DAE seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. A barra de erros indica o erro padrão entre os dados. Botucatu/SP, 2014.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação a intoxicação ocasionada pelo herbicida amônio glufosinate em plantas de algodão, a cultivar suscetível FM 993 aos 2 dias após a aplicação dos tratamentos já apresentou atingindo aos 15 DAA morte de mais de 90% das plantas, em todas as doses aplicadas. A cultivar Liberty Link IMACD 6001LL apresentou máxima intoxicação na faixa dos 15% para a maior dose aos 36 DAA. Embora a cultivar FM 975WS apresentou comportamento semelhante à cultivar resistente LL, houve maior intoxicação, na faixa de 35% da morte das plantas para maior dose aplicada.

Após o tratamento com amônio glufosinate, a taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas da cultivar suscetível decaiu acentuadamente até atingir o máximo de 95% aos 8 DAA. Em plantas da cultivar Liberty Link a redução máxima da taxa de transporte de elétrons foi de 18% aos 22 DAA. E, a cultivar WideStrike apresentou redução máxima de 24% na ETR aos 2 DAA.

O teor de amônia em plantas da cultivar suscetível foi aumentado à medida que se aumentaram as doses dos tratamentos, devido a maior concentração de amônio e amônia no interior celular. As cultivares WS e LL apresentaram redução no teor de amônia para as doses de 1 e 2 L ha<sup>-1</sup> e, aos 57 DAA ambas também apresentaram expressiva redução do teor de amônia, incluindo a testemunha, o que pode ser uma expressão do gene *pat*.

A cultivar FM 993 apresenta aumento no teor de glutamato conforme aumentam as doses do herbicida, pois assim como justificado na revisão de literatura, o herbicida promove inibição da enzima responsável pela catalisação da reação de síntese de glutamina que utiliza o glutamato como substrato.

O glufosinate apresenta comportamento similar à amônia nas três cultivares: aumento conforme aumentam-se as doses na cultivar FM 993 e para as cultivares IMACD 6001LL e FM 975WS ocorre redução nas doses de 1 e 2L. Aos 57 DAA para as cultivares que apresentam o gene *pat* ocorre redução no conteúdo interno de glufosinate até nas plantas testemunhas, comportamento que pode ser uma característica do gene.

Considerando que a hipótese do trabalho era de que a cultivar de algodão FM 975WS por apresentar em seu DNA o gene PAT apresentaria o comportamento de seu metabolismo intermediário às cultivares convencional e Liberty Link, com os resultados obtidos neste experimento a hipótese foi atendida e, observa-se que foi o de fato que ocorreu.

Para melhor compreender se o comportamento observado aos 57 DAA nas cultivares que apresentam o gene *pat*, seriam necessários estudos comparativos por um período maior entre materiais transgênicos com seus parentais não transgênicos. Assim, poderia verificar se tenderia o comportamento de redução ou aumentaria com o decorrer do tempo.

## 8 CONCLUSÕES

A partir das variáveis de comportamento do metabolismo avaliadas para as três cultivares de algodão, conclui-se:

- A cultivar de algodão FM 975WS apresentou comportamento metabólico semelhante à cultivar IMACD 6001LL (resistente ao herbicida amônio glufosinate) e diferente da cultivar FM 993 (convencional);
- Até a dose comercial, a cultivar FM 975WS:
  - Manteve os níveis de amônia e glutamato, não acumulando amônia e glutamato;
  - Metabolizou glufosinate ao ponto de não propiciar intoxicação e morte das plantas;
  - Preservou os níveis de produção de serina;
  - Manteve as mesmas taxas do transporte de elétrons;
  - Não ocasionou elevada intoxicação às plantas.

## 9 ANEXO



Figura 23. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 993 aos 3 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.

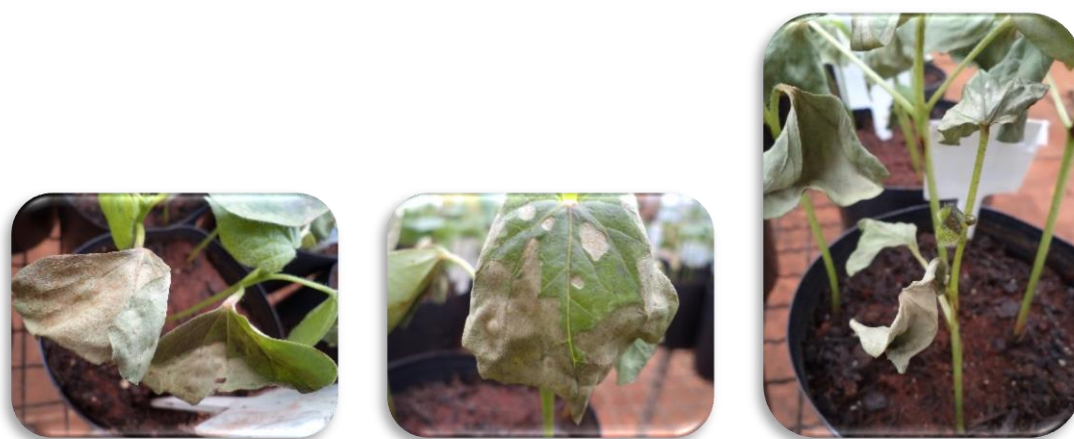


Figura 24. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 993 aos 6 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 25. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 993 aos 16 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 26. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 3 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 27. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 6 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 28. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 24 DAA: testemunha; dose de 1L; 2L e 3L, respectivamente, submetidas a uma única aplicação. Botucatu/SP, 2014.



Figura 29. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 35 DAA, na dose de 1L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 30. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 35 DAA, na dose de 2L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 31. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar IMACD 6001LL aos 35 DAA, na dose de 3L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 32. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 3 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 33. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 6 DAA, nas doses de 1L; 2L e 3L, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 34. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 24 DAA: testemunha; dose de 1L; 2L e 3L, respectivamente, submetidas a uma única aplicação. Botucatu/SP, 2014.



Figura 35. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 35 DAA, na dose de 1L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 36. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 35 DAA, na dose de 2L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.



Figura 37. Sintomas de fitotoxicidade do herbicida amônio glufosinate sobre a cultivar FM 975WS aos 35 DAA, na dose de 3L com uma, duas e três aplicações, respectivamente. Botucatu/SP, 2014.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ANDERSON, D. M. et al. The influence of soil moisture, simulated rainfall and time of application on the efficacy of glufosinate-ammonium. **Weed Research**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 149-160, 1993.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 8. ed. São Paulo: Andrei Editora, 2009. 499 p.

ARAGÃO, N. M., VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v.32, n.9, p. 2476-2481, 2009.

ARALDI, R. **Avaliação da absorção do amicarbazone e intoxicação em cana-de-açúcar e plantas daninhas**. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) -Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE - ARS. Pesticide Properties DataBase. 2009. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=14199>>. Acesso em: 05 mai. 2014.

ASHLEY, P. A. B. C. Labeled photosynthate translocation and utilization in cotton plants. **Crop Science**, v. 12, p. 69-74, 1972.

ASSOCIAÇÃO SUL-MATOGROSSENSE DOS PRODUTORES DE ALGODÃO - AMPASUL. História do Algodão, 2010. Disponível em: <<http://www.ampasul.com.br/institucional.php?tag=6>>. Acesso em: 24 abr. 2014.

- AZEVEDO, D. M. P. et al. Manejo de plantas daninhas no cultivo do algodoeiro herbáceo. **Comunicado Técnico** 35, 11p., 1993.
- BARBERIS, L. R. M. **Metodologia para determinação de efeitos fisiológicos de metabólicos do glufosinate em soja**. 2012. 75f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.
- BARNETT, K.A. et al. Influence of glufosinate timing on cotton growth and yield. In: Beltwide Cotton Conference, 2011, Atlanta. **Proceedings...** p. 1562.
- BELTRÃO, N.E. de M. Manejo e controle de plantas daninhas em algodão. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.S. (Eds.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. cap.8, p.215-250.
- BENEDICT, C. R. Physiology. In: KOHEL, R. J.; LEWIS, C. F. (Eds.). **Cotton**. Madison: American Society of Agronomy, 1984. p. 151-200.
- BERIAULT, J.N. et al. Phloem transport of D, L-glufosinate and acetyl-L-glufosinate in glufosinate resistant and susceptible *Brassica napus*. **Plant Physiology**, v. 121, p. 619-627, 1999.
- BOTTERMAN, J. et al. Characterization of phosphinothricinacetyltransferase and C-terminal enzymatically active fusion proteins. **Gene**, v.102. p. 33-37, 1991.
- BOTTERMAN, J.; LEEMANS, J. Discovery, transfer to crops, expression and biological significance of a bialaphos resistance gene. **British Crop Protection Council**, v. 42, p. 63-68, 1989.
- CABALLERO, S. S. U. Fixação biológica de nitrogênio. Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica. 2011. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_31\\_711200516717.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_31_711200516717.html)> Acesso em: 30 abr 2014.
- CARDOSO, G. D. et al. Períodos de interferência das plantas daninhas em algodoeiro de fibracolorida 'BRS Safira'. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 3, p. 456-462, 2010.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. et al. Manejo de Plantas Daninhas na Cultura do Algodão. In: FREIRE, E.C. **Algodão no Cerrado do Brasil**. 2 ed. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão – ABRAPA, 2011. p.613-638.
- COETZER, E.; AL-KHATIB, K; LOUGHIN, T.M. Glufosinate efficacy, absorption, and translocation as affect by relative humidity and temperature. **Weed Science**, v.49, p.8-13, 2001.
- COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBio. **Liberação Comercial de algodão geneticamente modificado**. PARECER TÉCNICO N° 1521/2008. 2008.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBio. **Liberação Comercial de algodão geneticamente modificado. PARECER TÉCNICO N° 1757/2009.** 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. 6° Levantamento Grãos - Safra 2013/14. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_03\\_12\\_08\\_41\\_24\\_boletim\\_graos\\_marco\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_03_12_08_41_24_boletim_graos_marco_2014.pdf)>. Acesso em: 24 abr. 2014.

CONSTANTIN, J. et al. Dessecação em áreas com grande cobertura vegetal: alternativas de manejo. **Informações Agrônomicas.**, n. 111, p. 7-9, 2005.

CONSTANTIN, J. Métodos de Manejo. In: OLIVEIRA JR, R.S; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba: OMNIPAX, 2011, p. 67-78.

CORREIA, N.M. et al. Influência do tipo e da quantidade de resíduos vegetais na emergência de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.24,.2, p.245-253, 2006.

COTTON INCORPORATED - AMERICA'S COTTON PRODUCERS AND IMPORTERS. **Monthly Economic Letter**. World Cotton Production. 2014. Disponível em: <<http://www.cottoninc.com/corporate/Market-Data/MonthlyEconomicLetter/pdfs/English-pdf-charts-and-tables/World-Cotton-Production-Bales.pdf>> Acesso em: 30 abr. 2014.

CULPEPPER, A.S. et al. Weed control and crop response to glufosinate applied to 'PHY 485 WRF' cotton. **Weed Technology**, v. 23, p. 356–362, 2009.

DAUBRESSE, C. M. et al. Glutamine Synthetase-Glutamate Synthase Pathway and Glutamate Dehydrogenase Play Distinct Roles in the Sink-Source Nitrogen Cycle in Tobacco, **Plant Physiology**, v. 40, p. 445, 2006.

DEVINE, M.; DUKE, S.O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. Englewood Cliffs: PTR Prentice Hall, p. 441, 1993.

DODDS, D.M. et al. Tolerance of WideStrike cotton to glufosinate. In: Beltwide Cotton Conference, 2011, Atlanta. **Proceedings...** p. 1562, 2011.

DONN, G. Der Einfluss von Klimafaktoren auf die herbizide Wirkung von ammonium-(3-amino-3-carboxy-propyl)-methylphosphinat (Glufosinate). Medel. Fac. Landbouwwetenschap. **Rijksuniv Gent**, Nussallee, v. 47, p. 105–110, 1982.

DORN, E. et al. Glufosinat-ammonium in der Umwelt: Abbau und Einfluss auf das Ökosystem. **Zeitschrift für Pflanzenkrankh und Pflanzenschutz**, v. 13, p. 459–468, 1992.

DOW CHEMICAL COMPANY. 2006. Product Safety Assessment WideStrike Insect Protection Disponível em: <<http://www.dow.com/productsafety/finder/ws.htm>>. Acesso em: 30 abr 2014.

DOWNS, C.G. et al. Hairy roots of *Brassica napus*: I. Applied glutamine overcomes the effect of phosphinothricin treatment. **Plant Cell Reports**, v.14, p. 37-40, 1994.

DRÖGE, W.; BROER, I.; PÜHLER, A. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. **Planta**, v. 187, p. 142–151, 1992.

DRÖGE et al. The Metabolites of the Herbicide L-Phosphinothricin (Glufosinate): Identification, Stability, and Mobility in Transgenic, Herbicide-Resistant, and Untransformed Plants. **Plant Physiology**, v. 105, n.1, p.159-166, 1994.

DUKE, S. O.; LYDON, J. Herbicides from natural compounds, **Weed Technology**, v.1, p.122-128, 1987.

DUKE, S. O.; LYDON, J. Natural phytotoxins as herbicides. In: DUKE, S. O.; MENN, J. J.; PLIMMER, J. R., (Eds.). **Pest control with enhanced environmental safety**. Washington: American Chemical Society, p. 111-121, 1993.

DUKE, S.O. et al. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, p. 99-111, 2000.

EVANGELHISTA JR., W.S. et al. Fitofagia de *Podisus nigrispinus* em algodoeiro e plantas daninhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 413-420, 2004.

EVERMAN, W. J. et al. Absorption, translocation, and metabolism of glufosinate in transgenic and nontransgenic cotton, palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*), and pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*). **Weed Science**, v. 57, n. 4, p. 357-361, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. 1998. Disponível em:  
[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMP](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMP).  
Acesso em: 30 abr. 2014.

FENTEM, P.A.; LEE, P.J.; STEWART, G.R. Ammonia assimilation in the roots of nitrate- and ammonia-grown *Hordeum vulgare* (cv Golden Promise). **Plant Physiology**, v. 71, p. 496–501, 1983.

FERREIRA, A.C. B. et al. Avaliação de coberturas vegetais semeadas na primavera e suas influências sobre o algodoeiro. In: VI Congresso Brasileiro de Algodão, 2007, Uberlândia. **Anais...Uberlândia: AMIPA, 2007. CD-ROM**.

FREIRE, E.C. et al. Manejo adequado de variedades transgênicas. Algodão Brasileiro Responsável (ABR) **Guia Técnico**. 2012. Disponível em:  
<[http://www.abrapa.com.br/biblioteca/Documents/guia\\_abrapa\\_net.pdf](http://www.abrapa.com.br/biblioteca/Documents/guia_abrapa_net.pdf)> Acesso em: 30 abr. 2014.

FREITAS, R. S. et al. Interferência de plantas daninhas na cultura de algodão em sistema de plantio direto. **Planta Daninha**, v. 20, n. 2, p. 197-205, 2002.

GIVAN, C.V. Aminotransferases of higher plants. In: MIFLIN, B.J. **The Biochemistry of Plants**, v. 5, p. 329-355, 1980.

GONÇALVES, F. F. **Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo de arroz irrigado**. 2007. 127 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

HAAS, P.; MULLER, F. Behaviour of glufosinate ammonium in weeds. In: British Crop Protection Conference Weeds, 1987, Bracknell. **Proceedings...** Bracknell: BCPC. p. 1075-1082, 1987.

HESKETH, J. Enhancement of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation em the absence of oxygen as dependent upon species and temperature. **Planta**, v.72, p. 371-374, 1967.

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

IGLESIAS, A. H. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas. Waters Technologies do Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2014.

KLEIER, D. A. Phloem mobility of xenobiotics: I. Mathematical model unifying the weak acid and intermediate permeability theories. **Plant Physiology**, v. 86, p. 803–810, 1988.

KÖCHER, H. Influence of the light factor on physiological effects of the herbicide HOE 39866, **Annals Applied Biology**, Oxford, v. 4, p. 227, 1983.

KOMOBA, D.; GENNITY, I.; SANDERMANN, H. Plant metabolism of herbicides with C-P bonds glyphosate. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 43, p. 85-94, 1992.

LACUESTA, M., B. et al. Time-course effect of phosphinothricin (PPT) on photosynthesis in *Medicago sativa*. **PhysiologiaPlantarum**, v. 89, n. 4, 1993.

LAM et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Reviews Plant Physiology. Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 569-593, 1996.

LANGELÜDDEKE, P.; BAEDEL, H.; BIERINGER, H. Trials on the influence of air humidity and rainfall on the efficacy of glufosinate-ammonium. In: Symposium Factors Influencing Herbicidal Activity and Selectivity, 1988, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen, p. 227-232, 1988.

MANDERSCHIED, R.; WILD, A. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum*L. **Journal of Plant Physiology**, v. 123, p.135-142, 1986.

- MANDERSCHIED, R. et al. Glufosinate treatment of weeds results in ammonia emission by plants. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 109, p. 129-140, 2005.
- MASCHOFF, J. R.; HART, S. E.; BALDWIN, J. L. Effect of ammonium sulfate on the efficacy, absorption, and translocation of glufosinate. **Weed Science**, v. 48, p. 2- 6, 2000.
- MATEUS, G. P.; CRUSCIOL, C. A. C.; NEGRISOLI, E. Palhada do sorgo de guiné gigante no estabelecimento de plantas daninhas em área de plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 6, p. 539-542, 2004.
- MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E. **Biochemistry**. Washington, DC: Benjamin Cummings Co., p. 1129, 1990.
- MATHIASSEN, S. K.; KUDSK, P. The influence of adjuvants on the activity, rainfastness and response to climatic conditions of glufosinate. In: Symposium Quantitative Approaches In: Weed And Herbicide Research And Their Practical Application, 1993, Braunschweig. **Proceedings...** Braunschweig: EWRS, p. 243-250, 1993.
- MERSEY, B. G. et al. Factors affecting the herbicidal activity of glufosinate-ammonium: absorption, translocation, and metabolism in barley and green foxtail. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 90-98, 1990.
- MESCHEDE, D. K.; FERREIRA, A. B.; RIBEIRO JR, C. C. Avaliação de diferentes coberturas na supressão de plantas daninhas no cerrado. **Planta Daninha**, v. 25, p. 465-471, 2007.
- MIFLIN, B. J.; LEA, P.J., Amino acid metabolismo. **Annual Reviews Plant Physiology**, v. 28, p. 299-329, 1977.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. 2003. Disponível em:  
<[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 11 set. 2013.
- MONTAGUE, A. et al. High-efficiency phosphinothricin-based selection for alfalfa transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, n.1, p. 29-36, 2007.
- MÜLLER et al. Metabolism of the herbicide glufosinate ammonium in plant cell cultures of transgenic (rhizomania-resistant) and non-transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris*), carrot (*Daucus carota*), purple foxglove (*Digitalis purpurea*) and thorn apple (*Datura stramonium*). **Plant Management Science**, v. 57, p. 46-56, 2001.
- MULLNER, H.; ECKES, P.; DONN, G. Engineering crop resistance to the naturally occurring glutamine synthetase inhibitor phosphinothricin. **ACS Symposium Series. Pest Control with Enhanced Environmental Safety**, v.3, p.38-47, 1993.

- PAES, J. M. V.; REZENDE, A. M. Manejo de plantas daninhas no sistema plantio direto na palha. **Inf. Agropec.**, v. 22, n. 208, p. 37-42, 2001.
- PETERSEN, J.; HURLE, K. Einsatz von Liberty zur Klettenlabkrautbekaämpfung in glufosinatresistentem Winterraps. **Z PflKrankhPflSchutz**, Sonderh, v. 17, p. 389-396, 2000.
- PETERSEN, J.; HURLE, K. Influence of climatic conditions and plant physiology on glufosinate-ammonium efficacy, **Weed Research**, v. 41, p. 31–39, 2001.
- PITELLI, R. A.; DURIGAN, J. C. Terminologia para períodos de controle e de convivência das plantas daninhas em culturas anuais e bianuais. In: Congresso Brasileiro De Herbicidas E Plantas Daninhas, 15., 1984, Belo Horizonte. **Resumos...** Piracicaba: SBHED, 1984. p. 37.
- PITELLI, R.A. – Interferência das plantas daninhas nas culturas agrícolas. **Informe agropecuário**, 11(29): 16-27, 1985.
- PITELLI, R. A. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série Técnica Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, v. 4, n. 12, p. 1-12, 1987.
- QUEIROGA, C. L. Analisadores de massa: QTRAP. In: QUEIROGA, C. L. Espectrometria de massas: princípios e aplicações. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/>>. Acesso em: 29 abr. 2014.
- RASCHE, E.; CREMER, J. G. D.; ZINK, J. The development of glufosinate ammonia tolerant crops into the market. Proc. Br. **Crop Protection Conferece Weeds** v. 3, p. 791–800, 1995.
- READE, J.P.H.; COBB, A.H. Herbicides: modes of action and metabolism. In: Naylor R.E.L. **Weed management handbook**. Oxford: Blackwell Science, p. 134–170, 2002.
- RIDLEY, S.M.; MCNALLY, S.F. Effects of phosphinothricin on the isozymes of glutamine synthetase isolated from plant species which exhibit varying degrees of susceptibility to the herbicide. **Plant Science**, v. 39, p.31-36, 1985.
- RODRIGUES, B. N. e ALMEIDA, F. S. **Guia de Herbicidas**. 6 ed. Londrina: Edição dos autores, p. 83 – 92, 2011.
- ROMAN, E. S. et al. **Como Funcionam os Herbicidas: da Biologia à Aplicação**. 1 ed. 2007. 57 p.
- ROSS, M. A.; LEMBI, C. A. **Applied Weed Science**. Macmillan Publishing Company, New York, N, 1985, 340 p.
- RUEDELL, J. **Plantio direto na região de Cruz Alta**. Cruz Alta: FUNDACEP FECOTRIGO, 1995. 134 p.

RUHLAND, M.; ENGELHARDT, G.; PAWLIZKI, K. A comparative investigation of the metabolism of the herbicide glufosinate in cell cultures of transgenic glufosinate-resistant and non-transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) and corn (*Zea mays*). **Environmental Biosafety Research**, v. 1, n. 1, p. 29-37, 2002.

RUHLAND, M.; ENGELHARDT, G.; PAWLIZKI, K. Distribution and metabolism of D/L, L- and D-glufosinate in transgenic, glufosinatetolerant crops of maize (*Zea mays* L. ssp mays) and oilseed rape (*Brassica napus* L. varnapus). **Pest Management Science**, v. 60, p. 691–696, 2004.

SALGADO, T. P. et al. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 373-379, 2002.

SANDMANN, G.; BÖRGER, P. Inhibition of carotenoid biosynthesis by herbicides. **Target Sites of Herbicide Action**. Boca Raton, FL: CRC. p. 25-44, 1989.

SAUER, H.; WILD, A. RÜHLE, W. The effect of phosphinothricin on photosynthesis II. The causes of inhibition of photosynthesis. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 42c, p.270-278, 1987.

SELLERS, A. B.; SMEDA, R.J.; LI, J.. Glutamine synthetase activity and ammonium accumulation is influenced by time of glufosinate application. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 78, p. 9-20, 2004.

SHELP, B.; SWANTON, C.J.; HALL, J.C. Glufosinate (phosphinothricin) mobility in young soybean shoots, **Journal of Plant Physiology**, v.139, p. 626–628, 1992.

SILVA, I.F.P. **Velocidade de absorção do glufosinate e seus efeitos em plantas daninhas e algodão**. 2012. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina, 1995. p.42

SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.94-113.

STECKEL, G. J. et al. Absorption and translocation of glufosinate on four weed species. **Weed Science**, v. 45, p. 378-381, 1997.

STECKEL, L.E. et al. Evaluation of WideStrike flex cotton response to over-the-top glufosinate tank mixtures. **Journal of Cotton Science**, v. 16, p.88–95, 2012.

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.

TACHIBANA, K. et al. Inhibition of glutamine synthetase and quantitative changes of free amino acids in shoots of bialaphos treated Japanese barnyard millet. **Journal of Pest Science**, v. 11, p. 27-31, 1986.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p.343-368.

TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. **Amino Acids**, v.30, p. 195–204, 2006.

TEBBE, C.C.; REBER, H.H. Utilization of the herbicide phosphinothricin as a nitrogen source by soil bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.103–105, 1988.

TEMPLE, S.J.; VANCE, C.P.; GANT, J. S. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. **Trends in Plant Science**, v.3, n.2, p.51-56, 1998.

THE ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. Module II: herbicide biochemistry, herbicide metabolism transgenic plants. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, n.25, 2002. Disponível em: <<http://www.oecd.org/science/biotrack/46815748.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2013.

THOMPSON C.J. et al. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. **Embo Journal**, v.6, n. 9, p. 2519–2523, 1987.

TSAI, C.; WANG, C.S.; WANG, C.Y. Physiological characteristics of glufosinate resistance in rice. **Weed Science**, v. 54, n. 4, p. 634-640, 2006.

VASIL, I.K. Phosphinothricin-resistant crops. In: DUKE, S. O. **Herbicide-resistant crops: Agricultural environmental, economic, regulatory and technical aspects**. New York: Lewis, p. 85-91, 1996.

VAUGHN, KC.; DUKE, S.O. Biochemical basis of herbicide resistance. **Chemistry of Plant Protection**, v. 7, p. 141–169, 1991.

VILELA, P.M.C.A; BELOT, J. L.; MORELLO, C.L. Escolha da variedade. In: BELOT, J. L. **Manual de Boas Práticas**. Cuiabá: Casa da Árvore, p. 63-66, 2012.

WANAMARTA, G.; PENNER, D. Foliar absorption of herbicides. **Weed Science**, v. 4, p. 215-231, 1989.

WEHRMANN, A. et al. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 1274–1278, 1996.

WENDLER, C.; BARNISKE, E.M.; WILD, A. Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C3 and C4 Plants. **Photosynthesis Research**, v. 24, p. 55–61. 1989.

WENDLER, C.; PUTZER, A.; WILD, A. Effect of glufosinate (phosphinothricin) and inhibitors of photorespiration on photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 139, p. 666–671, 1992.

WHITAKER, J. et al. Weed management with glyphosate- and glufosinate-based systems in PHY 485 WRF Cotton. **Weed Technology**, v. 25, p.183–191, 2011.

WILD, A.; MANDERSCHIED, R. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 39, p. 500-504, 1984.

WILD, A.; SAUER, H.; RÜHLE, W. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis I. Inhibition of photosynthesis and accumulation of ammonia. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 42c, p. 263-269, 1987.

WILD, A.; WENDLER, C. Effect of glufosinate (phosphinothricin) on amino acid content, photorespiration and photosynthesis. **Pesticide Science**, v.30, p. 422–424, 1990.

WILD, A.; WENDLER, C. Inhibitory action of glufosinate on photosynthesis. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 48, p. 367–373. 1993.

WOO, K.C. e OSMOND, C.B. Stimulation of ammonia and 2-oxoglutarate-dependent O<sub>2</sub> evolution in isolated chloroplasts by dicarboxylates and the role of the chloroplast in photorespiratory nitrogen recycling. **Plant Physiology**, v. 69, n. 3, p. 591-596, 1982.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA - WSSA: **Herbicide Handbook**, p. 147–149, 1994.

ZIEGLER, C.H.; WILD, A. The effect of bialaphos on ammonium assimilation and photosynthesis II. Effect on photosynthesis and photorespiration. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 44, p. 103-108, 1989.