

FÁBIO HENRIQUE KRENCHINSKI

**GLUFOSINATE E ASSOCIAÇÕES COM HERBICIDAS EM TECNOLOGIAS DE
MILHO COM O GENE FOSFINOTRICINA ACETYLTRANSFERASE**

**Botucatu
2018**

FÁBIO HENRIQUE KRENCHINSKI

**GLUFOSINATE E ASSOCIAÇÕES COM HERBICIDAS EM TECNOLOGIAS DE
MILHO COM O GENE FOSFINOTRICINA ACETYLTRANSFERASE**

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

Orientador: Prof. Dr. Caio Antonio
Carbonari

Coorientador: Prof. Dr. Alfredo Junior
Paiola Albrecht

Botucatu

2018

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

K92g Krenchinski, Fábio Henrique, 1991-
Glufosinate e associações com herbicidas em tecnologias de milho com o gene fosfinotricina acetyltransferase / Fábio Henrique Krenchinski. - Botucatu: [s.n.], 2018
89 p.: fots. color., grafs. color., tabs.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018
Orientador: Caio Antonio Carbonari
Coorientador: Alfredo Junior Paiola Albrecht
Inclui bibliografia

1. Milho - Produtividade. 2. Resistência a herbicidas. 3. Plantas transgênicas. I. Carbonari, Caio Antonio. II. Albrecht, Alfredo Junior Paiola. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: GLUFOSINATE E ASSOCIAÇÕES COM HERBICIDAS EM TECNOLOGIAS DE MILHO COM O GENE FOSFINOTRICINA ACETYLTRANSFERASE

AUTOR: FÁBIO HENRIQUE KRENCHINSKI

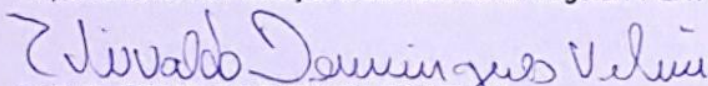
ORIENTADOR: CAIO ANTONIO CARBONARI

COORIENTADOR: ALFREDO JUNIOR PAIOLA ALBRECHT

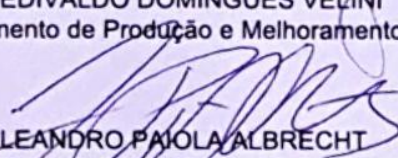
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI
Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal / FCA / UNESP de Botucatu/SP



Prof. Dr. LEANDRO PAIOLA ALBRECHT
Ciências Agrônomicas / Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina

Botucatu, 31 de julho de 2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Benjamin e Tânia,

Aos meus irmãos Leandro e Kelli,

A minha noiva Fernanda,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço imensamente a Deus, pelas grandes bênçãos, pelas pessoas que tenho encontrado em meu caminho, pela força, determinação, coragem, satisfação e paz que me proporciona todos os dias em minha vida.

A minha noiva Fernanda, pelo carinho, amor e paciência durante esse período.

Aos meus pais Benjamin e Tânia, por todo apoio e por fazerem parte desta grande conquista.

Aos meus irmãos Kelli e Leandro, a minha cunhada Vanessa e minha sobrinha Maria Júlia, por todo o carinho.

Aos Professores Caio Antonio Carbonari e Edivaldo Domingues Velini, pela confiança depositada em mim, pela orientação, ensinamentos, paciência, amizade e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação em gerar conhecimento na área das plantas daninhas.

Aos professores Alfredo Junior Paiola Albrecht e Leandro Paiola Albrecht, pela amizade, estímulo, ensinamentos e pela iniciação na ciência das plantas daninhas e agronomia.

Ao professor Ivan de Godoy Maia e a doutoranda Mariana, pelo auxílio.

Aos meus amigos e colegas, especialmente ao Bruno, Danilo, Natalia, Renato, Victor e Vinicius pelo auxílio nas atividades, trabalho em equipe e pelas horas de lazer juntos.

Aos técnicos Guilherme, Marcelo e Roberto pelo auxílio nas atividades, ensinamentos e companheirismo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

Ao departamento de Agricultura da FCA – UNESP e ao programa de Pós-Graduação que abriram as portas para mim e me deram suporte para que eu pudesse alcançar esse importante objetivo em minha carreira profissional.

À equipe da Fazenda Lageado, FCA – UNESP, que me auxiliou com insumos agrícolas e nas atividades de campo para aquisição de resultados de alta qualidade.

Enfim, a todos que de uma ou de outra forma estiveram presentes me ajudando a construir essa grande conquista.

Muito obrigado!

“Primeiro, lembre-se de olhar para as estrelas lá no alto e não para os seus pés lá embaixo. Dois, nunca desistam do seu trabalho. O trabalho lhe dá sentido e propósito, e a vida é vazia sem isso. Três, se você for afortunado a ponto de encontrar amor, lembre-se de que ele está ali e nunca o jogue fora. ”

Stephen Hawking

RESUMO

O gene fosfinotricina acetyltransferase (*pat*) produz a enzima PAT, que por n-acetilação é capaz de metabolizar o glufosinate, transformando-o em n-acetyl-L-glufosinate (NAG). Assim, plantas transgênicas contendo esse gene resistem às aplicações desse herbicida. No milho, esse gene foi inserido como marcador de seleção e mais estudos precisam ser realizados a fim de validar o uso dessa tecnologia. Nesse contexto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar se a expressão do gene *pat* é proporcional ao nível de resistência de tecnologias de milho à aplicação de glufosinate e avaliar a seletividade de herbicidas em associação ao glufosinate em milho com o gene *pat*. Durante o primeiro trabalho, foram utilizados híbridos de milho com as tecnologias Herculex[®]; Agrisure TL[®]; Herculex Yieldgard[®]; Leptra[®]; Viptera 3[®]; Power Core[®] com o gene *pat* e VT PRO[®] sem o gene *pat*. Para isso, um experimento foi realizado para avaliar a expressão relativa do gene *pat* nos híbridos de milho, por meio de PCR em tempo real. Em outro estudo, foram aplicadas doses de glufosinate (0, 500, 1000, 2000 e 4000 g i.a ha⁻¹) sobre os híbridos de milho, no qual foram avaliados os teores de glufosinate e NAG, assim como acúmulo de amônia, taxa de transporte de elétrons (ETR), injúria visual e acúmulo de biomassa. Em campo, foi realizada a aplicação de 500 g i.a ha⁻¹ de glufosinate durante o estágio V4 do milho, e foi avaliado o rendimento de grãos. Um segundo estudo foi realizado a campo, adotando-se a tecnologia Power Core[®], e os tratamentos foram: glufosinate; glyphosate; glufosinate + glyphosate; glufosinate + nicosulfuron; glufosinate + atrazine; glufosinate + tembotrione; glufosinate + mesotrione; glufosinate + carfentrazone ethyl; glufosinate + bentazon; glufosinate + 2,4-D; testemunha sem capina e testemunha capinada. As avaliações realizadas foram: injúria visual, ETR, quantificação de amônia, altura, rendimento de grãos, além de nota de controle visual de plantas daninhas. As tecnologias VT PRO[®], Herculex[®], Agrisure TL[®] e Viptera 3[®] apresentaram menor expressão do gene *pat*, e consequentemente menor teor de NAG, maiores teores de glufosinate e amônia, maior injúria visual, assim como maior redução em ETR e acúmulo de biomassa. O rendimento de grãos não foi afetado negativamente pela aplicação de 500 g i.a ha⁻¹ em nenhum dos híbridos testados. Conclui-se que a expressão do gene *pat* é proporcional ao nível de resistência de cada

tecnologia nos híbridos de milho. A adoção da aplicação de glufosinate em associação a outros herbicidas não proporcionou redução de produtividade no milho.

Palavras-chave: gene *pat*. N-acetyl-L-glufosinate. L-fosfinotricina. Produtividade de milho.

ABSTRACT

The phosphinothricin acetyltransferase (*pat*) gene produces the enzyme PAT, which by n-acetylation is able to metabolize the glufosinate, transforming it into n-acetyl-L-glufosinate (NAG). So transgenic plants containing this gene resist the applications of this herbicide. In corn, this gene was inserted as a selection marker and further studies are needed to be performed to validate this technology use. In this context, the objectives of the present work were to evaluate if the expression of the *pat* gene is proportional to the resistance level of maize technologies submitted to the application of glufosinate and also to evaluate the selectivity of some others herbicides in association with glufosinate in maize which presents the *pat* gene. For the first work, the technologies used were: Herculex[®]; Agrisure TL[®]; Herculex Yieldgard[®]; Leptra[®]; Viptera 3[®]; Power Core[®] with the *pat* gene and VT PRO[®] without the *pat* gene. For this, an experiment was carried out to evaluate the relative expression of the *pat* gene in the technologies by RT-PCR. In another study, glufosinate (0, 500, 1000, 2000 and 4000 g a.i ha⁻¹) doses were applied to the technologies, in which the glufosinate and NGA contents, ammonia accumulation, electron transportation rate (ETR), visual injury and biomass accumulation were evaluated. In the field, the spraying of 500 g a.i ha⁻¹ of glufosinate in the V4 stage of maize was carried out in the technologies and grain yield was measured. For the second study the Power Core[®] technology was adopted, and the experiment was carried out in the field. The treatments were: glufosinate; glyphosate; glufosinate + glyphosate; glufosinate + nicosulfuron; glufosinate + atrazine; glufosinate + tembotrione; glufosinate + mesotrione; glufosinate + carfentrazone ethyl; glufosinate + bentazon; glufosinate + 2,4-D; no-weeding control and weeding control. Evaluations of visual injury, ETR, ammonia quantification, plant height and yield were carried out, as well as weed control. The VT PRO[®], Herculex[®], Agrisure TL[®] and Viptera 3[®] technologies showed lower *pat* gene expression, and consequently lower NAG content, as well as higher glufosinate content, ammonia accumulation, visual injury, reduced ETR and lower biomass accumulation. The yield was not affected by the application of 500 g a.i ha⁻¹. We conclude that the *pat* gene expression is proportional to the resistance level of each technology. The glufosinate use in combination with other herbicides did not provide a reduction in corn yield.

Keywords: *pat* gene. N-acetyl-L-glufosinate. L- phosphinothricin. Corn yield

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

Figura 1 - Representação da precipitação, temperatura média mínima e temperatura média máxima para o período referente a safra de 2016/17 nos municípios de Botucatu – SP (A) e São Manuel – SP (B). Fonte: Fazenda experimental de São Manuel e Fazenda experimental Lageado – UNESP.	35
Figura 2 - Cromatogramas do glufosinate (A) e n-acetyl-L-glufosinate (B), na concentração de 9,37 µg L ⁻¹	37
Figura 3 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) do gene pat (fosfinotricina acetyltransferase), antes da aplicação do herbicida glufosinate em sete tecnologias de milho. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais na coluna, entre as tecnologias, não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).	42
Figura 4 - Teor de glufosinate, n-acetyl-L-glufosinate (NAG) e teor total (mmol ⁻¹ g ⁻¹ massa fresca), após a aplicação de glufosinate de amônio nas doses de 500 e 1000 g i.a. ha ⁻¹ em sete tecnologias de milho, aos 2 DAA. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais em cada coluna, entre as tecnologias não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).	43
Figura 5 - Teor de glufosinate, n-acetyl-L-glufosinate (NAG) e teor total (mmol ⁻¹ g ⁻¹ massa fresca), após a aplicação de glufosinate de amônio nas doses de 500 e 1000 g i.a. ha ⁻¹ em sete tecnologias de milho, aos 4 DAA. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais em cada coluna, entre as tecnologias não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).	44
Figura 6 - Porcentagem de degradação de glufosinate (% do total encontrado), após a aplicação de glufosinate de amônio nas doses de 500 e 1000 g i.a. ha ⁻¹ em sete tecnologias de milho, aos 2 e 4 DAA. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais em cada coluna, entre as tecnologias não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).	45
Figura 7 - Teor de amônia (mg kg ⁻¹ massa fresca) e amônia razão tratamento/testemunha, aos 2, 4 e 14 DAA de glufosinate nas doses de 500, 1000, 2000 e 4000 g i.a. ha ⁻¹ em sete tecnologias de milho. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas (tecnologias) e maiúsculas (doses) iguais em cada coluna, não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).	47

Figura 8 - Porcentagem da taxa de transporte de elétrons (ETR) das doses de glufosinate (500, 1000, 2000 e 4000 g i.a. ha ⁻¹) em relação a testemunha sem aplicação, as 0 e 6 horas e 1, 2, 3, 5, 8 DAA, em sete tecnologias de milho. Média ± intervalo de confiança.	49
Figura 9 - Porcentagem de injúria visual das doses de glufosinate (500, 1000, 2000 e 4000 g i.a. ha ⁻¹) em relação a testemunha sem aplicação, aos 0, 1, 2, 3, 7, 14 e 21 DAA, em sete tecnologias de milho. Média ± intervalo de confiança.	50
Figura 10 - Porcentagem de massa seca de plantas de milho em relação a testemunha aos 28 dias após a aplicação de glufosinate nas doses de 500, 1000, 2000 e 4000 g i.a. ha ⁻¹ em sete tecnologias de milho. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas (tecnologias) e maiúsculas (doses) iguais em cada coluna, não diferem entre si pelo teste t (p≤0,05).	52
Figura 11 - Amônia razão tratamento/testemunha, aos 2, 4 e 15 dias após a aplicação de glufosinate (500 g i.a. ha ⁻¹) em sete tecnologias de milho. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais dentro de cada data e entre as tecnologias não diferem entre si pelo teste t (p≤0,05).	54
Figura 12 - Porcentagem da taxa de transporte de elétrons (ETR) da dose de 500 (g i.a. ha ⁻¹) de glufosinate, em relação a testemunha sem aplicação, as 0 e 6 horas e 1, 2, 3, 5, 8 DAA, em sete tecnologias de milho. Média ± intervalo de confiança.	55
Figura 13 - Porcentagem de injúria visual da dose (500 g i.a. ha ⁻¹) de glufosinate, em relação a testemunha sem aplicação, aos 7, 14 e 21 DAA, em sete tecnologias de milho. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais dentro de cada data e entre as tecnologias não diferem entre si pelo teste t (p≤0,05).	56
Figura 14 - Massa de 100 grãos (gramas) de plantas de milho com e sem a aplicação de glufosinate na dose 500 g i.a. ha ⁻¹ , em sete tecnologias de milho. Letras minúsculas iguais (entre as tecnologias) e maiúsculas iguais (entre doses dentro de cada tecnologia), não diferem entre si pelo teste t (LSD) (p≤0,05). Média ± intervalo de confiança.	57
Figura 15 - Produtividade (kg ha ⁻¹) de plantas de milho com e sem a aplicação de glufosinate na dose 500 g i.a. ha ⁻¹ , em sete tecnologias de milho. Letras minúsculas iguais (entre as tecnologias) e maiúsculas iguais (entre doses dentro de cada tecnologia), não diferem entre si pelo teste t (LSD) (p≤0,05). Média ± intervalo de confiança.	57

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Representação da precipitação, temperatura média mínima e temperatura média máxima para o período referente a safra de 2016/17 os municípios de Botucatu – SP (A) e São Manuel – SP (B). Fonte: Fazenda experimental de São Manuel e Fazenda experimental Lageado – UNESP73
- Figura 2** - Injúria visual de plantas de milho aos 7 e 14 dias (CV %: 9,24 e 8,70) e Amônia (razão tratamentos/testemunha capinada) aos 2 e 4 dias após a aplicação de herbicidas (CV %: 13,19 e 19,33) em pós-emergência, Botucatu e São Manuel – SP, na safra 2016/17. Médias $\pm$ Intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais entre as colunas de mesma cor não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....75
- Figura 3** - Taxa de transporte de elétrons (% ETR) em relação a testemunha capinada, as 3 horas (CV %: 7,89), 1 (CV %: 10,01), 2 (CV %: 8,32), 3 (CV %: 10,47), 5 (CV %: 6,10) e 7 (CV %: 4,17) dias após a aplicação de herbicidas em pós-emergência, Botucatu e São Manuel – SP, na safra 2016/17. Médias $\pm$ Intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais entre as colunas de mesma cor não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), gráficos sem letras foram não significativos.....77
- Figura 4** - Altura de plantas de milho aos 14 dias após a aplicação [A (CV %: 4,47)] e no estágio R6 [A (CV %: 9,81)] e Produtividade de milho [B (CV %: 7,83)] após a aplicação de herbicidas em associação na pós-emergência, Botucatu e São Manuel – SP, na safra 2016/17. Médias $\pm$ Intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais entre as colunas de mesma cor não diferem significativamente pelo teste de Tobey ($p \leq 0,05$), gráficos sem letras foram não significativos.....79
- Figura 5** - Controle de plantas daninhas das espécies *Raphanus raphanistrum*, *Cyperus rotundus* [A (CV %: 4,40 e 13,50)]; *Urochloa plantaginea*, *Richardia brasiliensis* [B (CV %: 10,20 e 6,25)] aos 28 DAA, na cultura do milho após a aplicação de herbicidas em pós-emergência, Botucatu e São Manuel – SP, na safra 2016/17. Médias $\pm$ Intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais entre as colunas de mesma cor não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....80

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Sequência de primers empregados nas análises de validação da expressão genica de folhas de milho de diferentes tecnologias contendo o gene <i>pat</i> , para RT-qPCR.....	32
Tabela 2 - Características químicas e físicas do solo da área experimental de Botucatu e São Manuel SP.....	34
Tabela 3 - Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização negativo e positivo: glufosinatete e n-acetyl-L-glufosinate.....	36
Tabela 4 - P-value da análise de variância (ANOVA) das variáveis analisadas, nos experimentos em casa de vegetação. Botucatu - SP.....	41
Tabela 5 - P-value da análise de variância (ANOVA) das variáveis analisadas, nos experimentos de campo, em Botucatu e São Manuel - SP.....	53

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Características químicas e físicas do solo das áreas experimentais de Botucatu e São Manuel – SP.....	71
Tabela 2 - Tratamentos utilizados nos experimentos de milho, Botucatu e São Manuel - SP.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PAT	Enzima Fosfinotricina Acetyltransferase
<i>pat</i>	Gene Fosfinotricina Acetyltransferase
GS	Glutamina Sintetase
NAG	N-acetyl-L-glufosinate
RNA	Ácido ribonucleico
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico codificante
ETR	Taxa de Transporte de Elétrons

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	25
CAPÍTULO 1 - A RESISTÊNCIA AO GLUFOSINATE É PROPORCIONAL A EXPRESSÃO DO GENE FOSFINOTRICINA ACETYLTRANSFERASE EM TECNOLOGIAS DE MILHO ¹	27
Resumo	27
Abstract	27
1.1 INTRODUÇÃO.....	28
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
1.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO	30
1.2.2 ENSAIO 1. EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE PAT EM TECNOLOGIAS DE MILHO.....	31
1.2.2.1 Coleta do material, extração de RNA e síntese de cDNA	31
1.2.2.2 Desenho dos primers e PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)	32
1.2.3 ENSAIO 2. TEORES DE GLUFOSINATE, NAG, ACÚMULO DE AMÔNIA, ETR, INJÚRIA VISUAL E MASSA DA MATÉRIA SECA EM TECNOLOGIAS DE MILHO EM CASA DE VEGETAÇÃO, APÓS A APLICAÇÃO DE GLUFOSINATE	33
1.2.4 ENSAIO 3. ACÚMULO DE AMÔNIA, ETR, INJÚRIA VISUAL, RENDIMENTO DE GRÃOS E MASSA DE CEM GRÃOS DE SETE TECNOLOGIAS DE MILHO EM CAMPO, APÓS A APLICAÇÃO DE GLUFOSINATE.....	34
1.2.5 VARIÁVEIS ANALISADAS	35
1.2.5.1 Teor de glufosinate, n-acetyl-L-glufosinate (NAG), total e porcentagem de degradação do glufosinate.....	35
1.2.5.2 Injúria visual, ETR e massa da matéria seca	38
1.2.5.3 Teor de amônia	38
1.2.5.4 Produtividade e Massa de 100 grãos	39
1.2.6 ANÁLISE DOS DADOS	40
1.3 RESULTADOS	40
1.3.3 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EXPERIMENTOS EM CASA DE VEGETAÇÃO	40
1.3.2 EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE PAT	41
1.3.3 DEGRADAÇÃO DE GLUFOSINATE.....	42
1.3.4 TEOR DE AMÔNIA.....	46
1.3.5 TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR)	48
1.3.7 INJÚRIA VISUAL	50
1.3.8 MASSA DA MATÉRIA SECA	51
1.3.9 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EXPERIMENTOS EM CAMPO	52
1.3.10 TEOR DE AMÔNIA A CAMPO.....	53
1.3.11 ETR A CAMPO.....	54
1.3.12 INJÚRIA VISUAL A CAMPO	55
1.3.13 PRODUTIVIDADE E MASSA DE CEM GRÃOS	56
1.4 DISCUSSÃO	58
1.5 REFERÊNCIAS	63

	CAPÍTULO 2 - GLUFOSINATE ASSOCIADO COM HERBICIDAS EM PÓS-EMERGÊNCIA NO MILHO COM OS GENES CP4-EPSPS E PAT ¹	67
	RESUMO	67
	ABSTRACT	67
2.1	INTRODUÇÃO	68
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	70
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
2.4	REFERÊNCIAS	81
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE A – COLETA DAS FOLHAS DE MILHO (A), ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS INSTANTANEAMENTE EM NITROGÊNIO LÍQUIDO (B), MACERAÇÃO DAS AMOSTRAS EM ALMOFARIZ (C) E ARMAZENAMENTO EM TUBOS DE 2 ML (D).	87
	APÊNDICE B – QUANTIFICAÇÃO DE RNA EM NANO DROP ND-1000 SPECTROPHOTOMETER (A) VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA EM GEL DE AGAROSE A 1 % (B) E PCR EM TEMPO REAL DA MARCA ABI PRISM 7000 SEQUENCE DETECTOR SYSTEM.	88
	APÊNDICE C – PESAGEM DAS AMOSTRAS (A), SONICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM ÁGUA COM PH 3,5 (B), CURVA PADRÃO DE SULFATO DE AMÔNIA (C) E LEITURA DAS AMOSTRAS EM ESPECTROFOTÔMETRO (D), PARA QUANTIFICAÇÃO DA AMÔNIA NAS PLANTAS.	89

INTRODUÇÃO GERAL

O milho apresenta grande importância para o cenário mundial e brasileiro, devido principalmente a sua utilização na alimentação humana, animal e para produção de etanol. No Brasil o milho é cultivado praticamente em todo o território nacional, desde áreas de cultivo de subsistência, até regiões com alto investimento. É cultivado em duas épocas do ano: a primeira se refere ao verão, considerado como milho primeira safra e a segunda corresponde ao cultivo de inverno, considerado como milho segunda safra ou safrinha.

A cultura do milho apresenta alto potencial produtivo, quando cultivado em sistemas com emprego de alta tecnologia, como utilização de híbridos simples, emprego de práticas de adubação e controle de plantas daninhas, pragas e doenças, bem como utilização de cultivos com espaçamento reduzido, dentre outros fatores. Porém alguns fatores podem comprometer os altos rendimentos da cultura, como é o caso da interferência com as plantas daninhas. A interferência das plantas daninhas sobre o milho pode se dar pela competição direta por água, luminosidade e nutrientes ou de maneira indireta, por dificultar a colheita ou por serem hospedeiras de pragas e doenças.

O controle químico de plantas daninhas é o método mais empregado no milho. Atualmente, são registrados para a cultura 38 herbicidas, para aplicações em pré e/ou pós emergência (AGROFIT, 2018). Com o advento da transgenia, hoje é possível a aplicação seletiva e segura dos herbicidas glyphosate, glufosinate de amônio, 2,4-D e haloxyfop – methyl na cultura do milho.

O glufosinate de amônio (glufosinate), é um herbicida não seletivo, pertencente ao grupo químico da homoalanina substituída. 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 octanol/água ($\log K_{ow}$) $< 0,1$; Não é volátil – pressão de vapor $< 0,1 \text{ mPa}$. (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). É registrado no Brasil com as marcas comerciais Finale®, Liberty®, Patrol SL® e Fascinate BR®, ambas comercializadas na concentração de 200 g do seu ingrediente ativo por litro de produto comercial (AGROFIT, 2018). Seus sintomas aparecem como “encharcamento” nas folhas, que podem ser visualizados de um a três dias após a aplicação do produto, evoluindo para clorose, necrose e morte total da planta em até duas semanas.

Na cultura do milho, é possível a aplicação em pós emergência total do glufosinate, devido à inserção, por meio de transgenia, do gene fosfinotricina acetyltransferase (*pat*), que produz uma enzima de mesmo nome (PAT), capaz de metabolizar o glufosinate em n-acetyl-L-glufosinate (NAG), que não é tóxico para as plantas. No milho, o gene *pat* foi inserido em conjunto com os genes de resistência a insetos (*Bt*), como marcador de seleção nos eventos Bt11 e TC1507, que diferem entre si na construção do plasmídeo, porém apresentam o mesmo gene *pat* (CTNBIO, 2018). Esses eventos deram origem a várias tecnologias presentes no mercado de sementes de híbridos de milho, e assim, apresentam o gene *pat* em sua constituição, possibilitando a aplicação do glufosinate em pós emergência da cultura.

Vale destacar que os produtores têm realizado aplicações do herbicida glufosinate, isolado ou em associação com outros herbicidas em milho contendo o gene *pat*. Porém, não há informações suficientes e necessárias para a correta utilização e recomendação desse herbicida na cultura, pois a inserção do gene *pat* foi realizada como marcador de seleção. Além do mais, são observadas diferenças de construção do plasmídeo para inserção do gene *pat* entre as diferentes tecnologias disponíveis no mercado, o que pode provocar variações na resposta do milho ao glufosinate. Ainda não há informações suficientes sobre a adoção de associações de herbicidas com o glufosinate e seus efeitos na cultura do milho com o gene *pat*. Assim a hipótese levantada nesse trabalho é que as tecnologias de milho se comportam de maneira diferente após a aplicação de glufosinate de forma isolada ou em associação com outros herbicidas.

Nesse contexto, os objetivos do presente trabalho foram: avaliar se a expressão do gene *pat* é proporcional ao nível de resistência de tecnologias de milho ao glufosinate; controle de plantas daninhas, e a seletividade de herbicidas em associação ao glufosinate, em milho contendo os genes *pat* e *cp4-epsps*.

CAPÍTULO 1

A RESISTÊNCIA AO GLUFOSINATE É PROPORCIONAL A EXPRESSÃO DO GENE FOSFINOTRICINA ACETYLTRANSFERASE EM TECNOLOGIAS DE MILHO¹

Resumo

O gene fosfinotricina acetyltransferase (*pat*), confere resistência ao herbicida glufosinate pela transformação do mesmo em n-acetyl-L-glufosinate (NAG) e foi inserido como marcador de seleção em plantas de milho transgênico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a expressão do gene *pat* é proporcional ao nível de resistência de tecnologias de milho a aplicação de glufosinate. Foram estudadas sete tecnologias de milho: Herculex®; Agrisure TL®; Herculex Yieldgard®; Leptra®; Viptera 3®; Power Core® (com o gene *pat*) e VT PRO® (sem o gene *pat*). Foi avaliado a expressão do gene *pat* em RT-PCR. Posteriormente foram obtidos os níveis de resistência dessas tecnologias, avaliando-se os teores de glufosinate, n-acetyl-L-glufosinate, degradação do glufosinate, teor de amônia, taxa de transporte de elétrons (ETR), injúria, acúmulo de biomassa, e produtividade a campo. As tecnologias VT PRO®, Herculex®, Agrisure TL® e Viptera 3® apresentaram menor expressão do gene *pat*, e conseqüentemente menores teores de NAG e baixa degradação de glufosinate, aumentando o teor de amônia, assim como maior injúria visual, resultando em redução de ETR e menores incrementos na biomassa. A expressão do gene *pat* é proporcional ao nível de resistência observado em cada tecnologia de milho. O rendimento de grãos não foi afetado pela aplicação de glufosinate a campo.

Palavras-chave: gene *pat*, N-acetyl-L-glufosinate, acúmulo de amônia, taxa de transporte de elétrons.

Abstract

The phosphinothricin acetyltransferase (*pat*) gene confers resistance to the herbicide glufosinate by its transformation into n-acetyl-L-glufosinate (NAG). The gene was inserted as a selection marker in transgenic maize plants. The objective of the present work was to evaluate if the *pat* gene expression is proportional to the resistance level of maize technologies to glufosinate application. Seven corn technologies were studied: Herculex®; Agrisure TL®; Herculex + Yieldgard®; Leptra®; Viptera 3®; Power

¹ – Este capítulo será submetido na revista Journal of Agricultural and Food Chemistry, assim o mesmo encontra-se nas normas deste periódico.

Core® (with the *pat* gene) and VT PRO® (without the *pat* gene). The *pat* gene expression was evaluated in RT-PCR, and the glufosinate levels, n-acetyl-L-glufosinate, glufosinate degradation, ammonia content, electron transport rate (ETR), visual injury, biomass accumulation, and yield were also investigated. The VT PRO®, Herculex®, Agrisure TL® and Viptera 3® technologies showed lower expression of the *pat* gene, and consequently lower NAG contents and glufosinate degradation, as well as a reduced ETR and biomass accumulation. In contrast, it was observed a greater ammonia accumulation and a higher visual injury. The *pat* gene expression is proportional to the resistance level observed in each corn technology. The yield was not affected by the glufosinate application in the field.

Keywords: *pat* gene, N-acetyl-L-glufosinate, ammonium accumulation, electron transport rate.

1.1 Introdução

O herbicida glufosinate é proveniente da toxina natural fosfinotricina, isolada a partir dos fungos *Streptomyces viridochromogenes* e *Streptomyces hygroscopicus* (Dayan et al. 2009; Dayan e Duke, 2014). É um herbicida não seletivo, que atua inibindo a atividade da enzima glutamina sintetase (GS) (EC 6.3.1.2). A GS tem função de desintoxicação da amônia e produção do aminoácido glutamina, a partir de amônia e glutamato (Barnett et al. 2012). Plantas suscetíveis ao glufosinate apresentam, após a sua aplicação, deficiência de glutamina, intoxicação pelo acúmulo de amônia, glutamato e glioxalato, rompendo a estrutura de cloroplastos, concomitante à diminuição de ETR e inibição da fotossíntese (Dayan et al. 2015; Carbonari et al. 2016; Devine et al. 1993; Coetzer e Al-Khatib, 2001).

Híbridos de milho resistentes ao glufosinate apresentam a inserção do gene *pat* (fosfinotricina acetyltransferase), proveniente de *Streptomyces viridochromogenes*, que quando transcrito na planta produz a enzima Fosfinotricina Acetyltransferase (PAT) que tem a capacidade de inativar quimicamente o herbicida glufosinate em NAG (Droge et al. 1994), que não é um composto tóxico à planta e não gera a paralisação da GS (Hérouet et al. 2005; Tan et al. 2006).

O gene *pat* foi utilizado a fim de servir como marcador seletivo na cultura do milho, com sua inserção e expressão associada aos genes de resistência a insetos nos eventos Bt11 (*cry1Ab*) e TC1507 (*cry1F*) (CTNbio, 2018). Os eventos Bt11 e

TC1507 apresentam diferença entre si, na construção do plasmídeo, porém apresentam o mesmo gene *pat*. No evento Bt11 o plasmídeo utilizado foi o pZO1502 e no evento TC1507 o PHI899A (CTNbio, 2018). Essa diferença de construção do plasmídeo pode acarretar em mudanças de expressão e local de inserção do gene, nas plantas (Cui et al. 2016).

São comercializadas e disponibilizadas aos produtores, tecnologias de milho com o gene *pat* (resistentes ao glufosinate), oriundos dos eventos Bt11 e TC1507. Essas tecnologias permitem a aplicação do glufosinate, porém essa prática não é recomendada pelas empresas. Sabe-se que os produtores têm utilizado o glufosinate em milho resistente, devido ao controle de plantas daninhas resistentes ao glyphosate. Em híbridos de milho pertencentes a tecnologia Power Core® (TC1507), não há mudanças no rendimento de grãos e em parâmetros fisiológicos, após a aplicação de glufosinate na dose de 500 g i.a. ha⁻¹ (Krenchinski et al. 2018; Silva et al. 2017).

Porém, não há informações referentes a outras tecnologias presentes no mercado. Assim, em milho, tecnologias com o gene *pat*, podem apresentar níveis de resistência diferentes, dificultando a recomendação de uso do glufosinate. Sabe-se que em algodão com a tecnologia Liberty Link®, há maior expressão do gene fosfinotricina acetyltransferase (*bar*), em comparação com a tecnologia WideStrike® (gene *pat*), resultando em maior resistência para a primeira (Carbonari et al. 2016). Esses resultados demonstram que a tecnologia Liberty Link®, que foi desenvolvida para a resistência ao glufosinate, é mais resistente em relação a tecnologia WideStrike®, em que o gene *pat* foi utilizado como marcador de seleção, como no caso do milho.

Devido ao aumento da utilização de glufosinate em milho, para o controle de plantas daninhas resistentes ao glyphosate e à falta de informações sobre os possíveis danos do glufosinate nas tecnologias que apresentam o gene *pat* como marcador de seleção, mais estudos devem ser realizados para esclarecer e viabilizar a recomendação desse herbicida em milho, bem como entender aspectos ligados aos níveis de expressão do gene *pat*, atividade da enzima PAT, acúmulo de amônia, aspectos fisiológicos e rendimento de grãos em diferentes tecnologias de milho.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a expressão do gene *pat* é proporcional ao nível de resistência de tecnologias de milho a aplicação de glufosinate.

1.2 Material e Métodos

1.2.1 Características gerais dos experimentos realizados em casa de vegetação

Foram realizados três experimentos em casa de vegetação. O primeiro experimento refere-se à expressão relativa do gene *pat* em tecnologias de milho com a presença desse gene. O segundo ensaio foi conduzido em duplicata, com a intenção de avaliar os teores de glufosinate, NAG, acúmulo de amônia, ETR, injúria visual e massa da matéria seca, em sete tecnologias de milho com o gene *pat*, após a aplicação de glufosinate. Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Pesquisas avançadas em Matologia – Nupam, localizado na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA, da Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ Câmpus de Botucatu – SP. As condições proporcionadas pela casa de vegetação foram de temperaturas médias em torno de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em 60 % e luz natural.

Foram utilizadas sete tecnologias de milho, nas quais seis continham o gene *pat* como marcador de seleção (Herculex®; Agrisure TL®; Herculex Yieldgard®; Leptra®; Vipitera 3®; Power Core®) e uma foi denominada “sem *pat*” (VT PRO®), utilizada como testemunha padrão.

Para compor as unidades experimentais, foram utilizados vasos com capacidade de 2,8 litros, preenchidos com substrato Carolina® composto por turfa de esfagno, vermiculita e casca de arroz carbonizada, com pH 5,7 ($\pm 0,5$), os vasos foram adubados na proporção de 300 kg ha⁻¹ com a formulação 16-16-16 (NPK) para o suprimento dos nutrientes fundamentais para o desenvolvimento das plantas de milho. Foram semeadas 10 sementes por vaso, e após a emergência, foi realizado um desbaste para que permanecessem quatro plantas viáveis de milho, por vaso. As plantas foram mantidas em bancadas sob condição de plena luz antes e após a aplicação.

1.2.2 Ensaio 1. Expressão relativa do gene *pat* em tecnologias de milho

1.2.2.1. Coleta do material, extração de RNA e síntese de cDNA

As amostras foram coletadas em triplicata biológica, coletando-se todas as folhas da planta, momentos antes da aplicação do herbicida glufosinate, nesse momento as plantas estavam no estágio de V4 (quatro folhas totalmente expandidas). As amostras foram coletadas e colocadas instantaneamente em nitrogênio líquido para posterior armazenagem a -80°C até a análise. Cada tecnologia foi processada individualmente para a extração do RNA total.

Para extração de RNA total foi utilizado o método de Trizol Reagent (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA), seguindo os passos: (a) aproximadamente 300 mg de cada amostra foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido e acondicionados em tubos de 2 ml; (b) foi adicionado 1 ml de Trizol e as amostras foram homogeneizadas em vortex e, posteriormente, foram mantidas em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente; (c) transcorrida a incubação anterior, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos; (d) transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 2 ml; (e) foram adicionados 200 µl de clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas em vortex e permaneceram a temperatura ambiente por 3 minutos; (f) as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos; (g) transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 2 ml e foram adicionados 500 µl de álcool isopropanol a uma concentração de 100 % a uma temperatura de -20°C, então misturou-se por imersão de tubo e imediatamente as amostras foram acondicionadas em freezer a -20 °C, por 30 minutos; (h) as amostras foram centrifugadas a 13200 rpm a 4°C por 30 minutos; (i) o sobrenadante foi removido e foi adicionado 1 ml de etanol 70 % (H₂O DEPC) para a lavagem do pellet; (j) as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm a 4°C por 5 minutos e descartado o sobrenadante; (k) o pellet foi submetido a secagem e ressuspensão em 20 µl de H₂O DEPC.

O RNA foi quantificado em espectrofotômetro modelo: Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer (Saveen 1 Werner, Malmo, Suécia) e para avaliar sua qualidade e integridade aproximadamente 1 µg de RNA foi verificado em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo e submetido a 120 V por 25 minutos. As amostras de RNA total verificadas foram tratadas com DNaseI-RNase free segundo as

recomendações do fabricante (Promega Biosciences, Wisconsin, EUA), para eliminação de eventual contaminação com DNA genômico. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80 °C. A partir dos RNAs totais tratados com DNaseI-RNase free foi sintetizado o cDNA, de cada tratamento, utilizando-se o kit High Capacity seguindo as recomendações propostas pelo fabricante (Life Technologies, Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA) e, então, diluídas 10 vezes em água nucleases free. As amostras de cDNA utilizadas nas reações constituíram-se de três amostras para cada uma das tecnologias.

1.2.2.2 Desenho dos primers e PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Os primers utilizados neste estudo foram desenhados utilizando o programa Primer3 (Koressaar e Remm 2007; Untergasser et al. 2012), com base na sequência conhecida dos genes. Após a confecção, foi verificada a especificidade dos primers através da ferramenta BLAST no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os parâmetros utilizados no desenho dos primers foram: amplicon de 100 a 200 pares de bases, temperatura de anelamento de 60°C $\pm$ 1 e tamanho do primer de 20 a 24 pares de bases. Para a escolha e desenho do primer do gene normalizador (Folylpolyglutamate sintetase) foram seguidas as informações de Manoli et al. (2012). Os primers referentes a cada gene estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequência de primers empregados nas análises de validação da expressão genica de folhas de milho de diferentes tecnologias contendo o gene *pat*, para RT-qPCR.

Gene	Nome dos Primers	Sequencias (5' – 3')
<i>pat</i>	<i>patForward</i>	ACGATCCATCTGTTAGGTTGCA
	<i>patReverse</i>	CCATCCACCATGCTTGTATCCA
<i>FPGS</i> ¹	<i>FPGSForward</i>	ATCTCGTTGGGGATGTCTTG
	<i>FPGSReverse</i>	AGCACCGTTCAAATGTCTCC

¹ Folylpolyglutamate sintetase

As análises de qPCR foram realizadas empregando amostras de cDNA de cada tecnologia, as quais foram quantificadas com auxílio do espectrofotômetro (Nanodrop) e diluídas 10x. O reagente GoTaq qPCR Master Mix foi empregado conforme recomendação do fabricante (Promega) ajustando-se o volume final de cada reação para 10 µL dos quais: 5 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix 2x*, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo; 1 µL de cDNA amostral inteirando-se com água ultrapura livre de nucleases até atingir o volume final da reação, o aparelho utilizado foi o ABI PRISM 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Assim, foi possível observar que a eficiência dos primers alvos e do gene de referência apresentaram eficiências próximas e dentro dos limites aceitáveis, viabilizando a utilização dos ensaios. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50 °C, 10 min. A 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 seg. a 95 °C e 1 min. A 60 °C, finalizando com 15 seg. a 95 °C, 1 min. A 60 °C e 15 seg. a 95 °C.

1.2.3 Ensaio 2. Teores de glufosinate, NAG, acúmulo de amônia, ETR, injúria visual e massa da matéria seca em tecnologias de milho em casa de vegetação, após a aplicação de glufosinate

Os experimentos foram conduzidos em duplicata, porém repetidos em momentos distintos. Foram arranjados em delineamento inteiramente casualizados com cinco repetições, em esquema fatorial 7 x 5 (tecnologias x doses). Foram aplicadas 5 doses de glufosinate: 0, 500, 1000, 2000 e 4000 g i.a. ha⁻¹, do produto comercial Finale® (Bayer S.A., 200 g i.a. l⁻¹).

A aplicação do herbicida glufosinate foi realizada quando as plantas atingiram o estágio vegetativo V4 (quatro folhas totalmente expandidas), utilizando um pulverizador acondicionado em sala fechada, equipado com uma barra de pulverização constituída por quatro pontas do modelo XR 110.02, espaçadas entre si por 0,5 m e posicionadas a 0,5 m de altura em relação às plantas, com pressão constante de 2 bar (ar comprimido) e uma velocidade de deslocamento de 1 m s⁻¹, gerando um volume de calda de 200 l ha⁻¹.

1.2.4 Ensaio 3. Acúmulo de amônia, ETR, injúria visual, rendimento de grãos e massa de cem grãos de sete tecnologias de milho em campo, após a aplicação de glufosinate

Os experimentos foram conduzidos em campo em dois locais: o primeiro localizado no município de Botucatu – SP (22°50'38.7"S 48°25'29.2"W) e o segundo no município de São Manuel – SP (22°46'21.6"S 48°34'07.9"W). As características físicas e químicas de cada solo são apresentadas na Tabela 2. Anterior a semeadura, foi realizada uma calagem com o objetivo de elevar o V% para 60, e em sequência, foi realizada uma gradagem pesada. Na semeadura foi realizada uma adubação de base na dose de 300 kg ha⁻¹ da formulação 08-28-16 de NPK, em ambos locais.

Tabela 2 - Características químicas e físicas do solo da área experimental de Botucatu e São Manuel – SP.

Propriedades Químicas										
Local	pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%
	CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	mmol _c /dm ³						
Botucatu	5,1	21	21,6	1	4.3	30	13	48	98	59
São Manuel	4,9	5	27	1	3,4	15	6	25	37	50
Propriedades Físicas										
Local	Areia	Silte	Argila	Textura						
	g kg ⁻¹									
Botucatu	195	278	527	Argiloso						
São Manuel	844	39	117	Arenoso						

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema fatorial duplo 2 x 7 (doses x tecnologias). Foram utilizadas duas doses de glufosinate (0 e 500 g i.a. ha⁻¹) e sete tecnologias de milho. Em ambas as localidades, as tecnologias de milho foram semeadas na densidade de 60 mil sementes ha⁻¹, em espaçamento de 0,85 metros entre linhas. As sementes foram tratadas com a mistura comercial de piraclostrobina + fipronil (Standak Top®) na dose

de 200 ml para cada 100 kg de sementes. Durante o ciclo da cultura, não foi necessário realizar o manejo de pragas e doenças. As parcelas foram mantidas livres de plantas daninhas durante todo o ciclo.

A aplicação dos tratamentos foi realizada durante o estágio fenológico de V4 do milho, através de um pulverizador costal pressurizado a CO₂, com pressão constante de 2 BAR (ou 29 PSI), vazão de 0,65 L min.⁻¹, equipado com barra de 6 bicos com espaçamento de 50 cm equipados com pontas do tipo jato plano e modelo XR 110.02 (TeeJet). A pulverização foi realizada a uma altura de 50 cm do alvo em velocidade de 1 m.s⁻¹ e com volume de calda de 200 l ha⁻¹. As condições meteorológicas no momento da aplicação para temperatura foram de 24 e 28°C, umidade relativa do ar de 66 e 59 % e velocidade do vento de 1,01 e 1,23 Km h⁻¹, para a aplicação em Botucatu e São Manuel, respectivamente. Os dados meteorológicos de temperatura máxima e mínima, assim como precipitação obtidos durante a condução dos experimentos estão descritos na Figura 1.

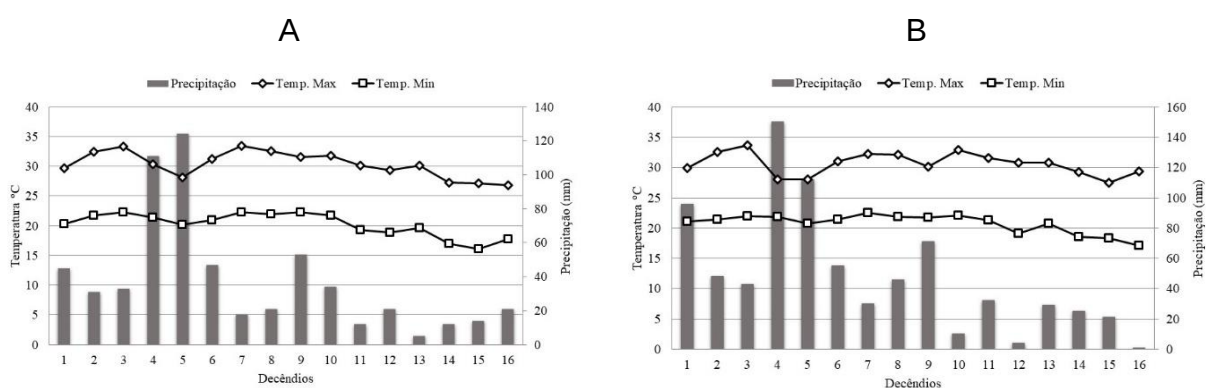


Figura 1 - Representação da precipitação, temperatura média mínima e temperatura média máxima para o período referente a safra de 2016/17 nos municípios de Botucatu – SP (A) e São Manuel – SP (B). Fonte: Fazenda experimental de São Manuel e Fazenda experimental Lageado – UNESP.

1.2.5 Variáveis analisadas

1.2.5.1 Teor de glufosinate, n-acetyl-L-glufosinate (NAG), total e porcentagem de degradação do glufosinate

Para um dos experimentos realizados em casa de vegetação, foram coletadas aos 2 e DAA, plantas das sete tecnologias, após a aplicação de glufosinate nas doses

de 500 e 1000 g i.a ha⁻¹. Após a coleta, as mesmas foram mantidas na temperatura de -80°C.

Durante a determinação de glufosinate e NAG, as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido, utilizando graal e pistilo e secas no vácuo. Pesou-se uma alíquota de 100 mg de cada amostra macerada, acondicionando-as em tubos falcon de 15 mL e posteriormente foram adicionados 10 mL da solução extratora metanol:água (80:20). As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Após centrifugação por 4.000 Rpm por 10 minutos, realizou-se a filtragem do sobrenadante das amostras através de filtros Millipore 0,2 µm, transferindo o conteúdo para vials (1,5 mL) e levando-as para análise em LC/MS/MS.

Para esta determinação de glufosinate e n-acetyl-L-glufosinate, 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. O mesmo é equipado com duas bombas LC20AD, autoinjeter SIL-20AC, degazeificador DGU-20^a5, sistema controlador CBM20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 4500 (Applied Biosystems) híbrido triplo quadrupolo. As condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização negativo e positivo estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização negativo e positivo: glufosinate e n-acetyl-L-glufosinate.

Coluna Analítica	Gemini 5 µ C18 110 Å (150mm x 4,6mm)
Fase móvel (pH 7.0)	Fase A (FA) = 5 mM acetato de amônio em água Fase B (FB) = 5 mM acetato de amônio em metanol
Gradiente	0 – 1 Minuto = 60 %FB e 40 % FA 1 – 3 Minutos = 95 % FB e 5 % FA 1 – 5 Minutos = 95 % FB e 5 % FA 5 – 7 Minutos = 60 % FB e 40 % FA 10- Termina
Fluxo	0,800 ml min ⁻¹

A Figura 2, representa os cromatogramas do padrão analítico dos compostos, glufosinate e n-acetyl-L-glufosinate e os fragmentos gerados a partir de cada um. As equações da curva analítica foram: para glufosinate, $y = 2.02 \cdot 10^{-6} x + 9,87 \cdot 10^{-5}$; para n-acetyl-L-glufosinate, $y = 9,54 \cdot 10^{-5} x + 4,84 \cdot 10^{-5}$.

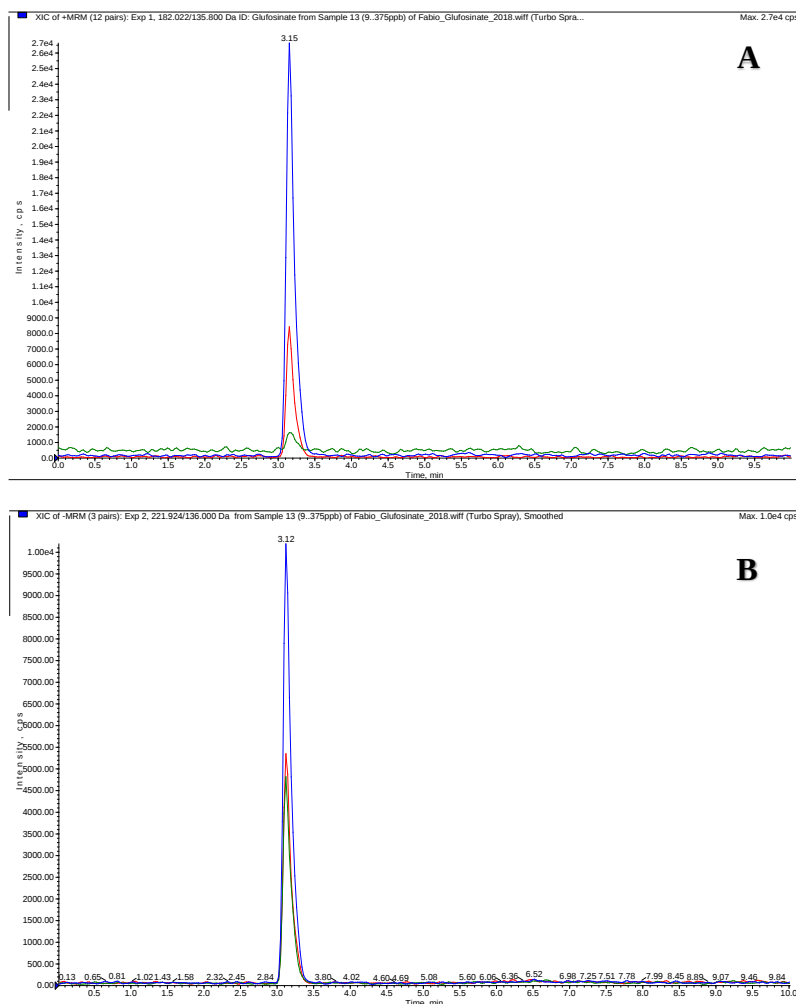


Figura 2 - Cromatogramas do glufosinate (A) e n-acetyl-L-glufosinate (B), na concentração de $9,37 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para as análises cromatográficas foi empregada uma coluna da marca phenomemex Gemini 5 μ C18 110^a, dimensões 150 x 4,5 mm, com volume de injeção de 20 μ l. A massa molecular do glufosinate (182.02), foi lida no modo ionização positiva e seus respectivos fragmentos foram: 135.8; 118.9; 164.8. Para a leitura de n-acetyl-L-glufosinate de massa molecular (221.924), no modo de ionização negativa e seus respectivos fragmentos foram: 136; 133,9; 134. O fragmento utilizado para quantificação de cada um dos compostos foi sempre o primeiro apresentado. A detecção e separação dos compostos foram realizadas em uma corrida e os tempos de retenção dos compostos retidos pela coluna cromatográfica foram: glufosinate

(3,15 minutos) e n-acetyl-L-glufosinate (3,12 minutos). Os dados finais foram expressos em $\text{mmol}^{-1} \text{g}^{-1}$ de massa fresca de plantas. A partir dos dados de glufosinate e n-acetyl-L-glufosinate, foi calculado o teor total (glufosinate + n-acetyl-L-glufosinate), bem como a porcentagem de degradação do glufosinate.

1.2.5.2 Injúria visual, ETR e massa da matéria seca

Tanto para os experimentos de campo, como em casa de vegetação, foram avaliadas as injúrias visuais provocadas pelo glufosinate, sendo estas aos 0, 1, 2, 3, 7, 14 e 21 dias após a aplicação (DAA) em casa de vegetação, e aos 7, 14 e 21 DAA em campo, adotando-se a porcentagem de 0 a 100, na qual 0 representa ausência de injúrias e 100 % representa a morte total das plantas, seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas daninhas (SBCPD, 1995). O ETR foi avaliado às 0, 6 horas e 1, 2, 3, 5 e 8 DAA com auxílio de um fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS5p – Opti Sciences), com leituras realizadas em seis pontos da folha mais jovem totalmente expandida de cada tratamento e repetição.

Somente nos trabalhos em casa de vegetação as plantas foram coletadas para se avaliar a massa da matéria seca. Para isso, a coleta ocorreu aos 28 DAA, na qual a planta foi cortada e armazenada em saco de papel previamente identificado e levada para secagem em estufa de circulação de ar forçada, a uma temperatura de 60°C, até peso constante. Posteriormente, as amostras foram pesadas em balança de precisão de quatro dígitos.

Os dados de injúria visual, ETR e massa da matéria seca foram expressos em porcentagem das doses de glufosinate aplicadas em relação a testemunha sem aplicação (0 g i.a. ha^{-1}), referente a cada respectiva tecnologia.

1.2.5.3 Teor de amônia

A análise de determinação do teor de amônia nos tecidos foliares foi avaliado nos experimentos de campo e casa de vegetação, utilizando-se o seguinte protocolo.

Para a extração da amônia, realizou-se aos 2, 4 e 14 DAA a coleta das folhas das plantas individualmente, que foram cortadas rente ao colmo, acondicionadas e pesadas em tubos com capacidade de 300mL, previamente identificados e pesados.

Os tubos contendo as folhas, foram preenchidos com água acidificada por ácido clorídrico (HCl), a pH 3,5, novamente pesados, e mantidos em banho de ultrassom (sonicação) por 60 minutos. Após esse período, as folhas foram retiradas.

Durante o período de sonicação, realizou-se o preparo dos reagentes sulfato manganoso, hipoclorito de sódio, e solução de fenol + hidróxido de sódio. O hipoclorito de sódio foi preparado adicionando-se 10 mL de NaClO (6 %) e 40 mL de água deionizada em um béquer, que, sob agitação, teve seu pH ajustado para 6,5, com a adição de ácido clorídrico (4M). Para o sulfato manganoso (0,05 Molar), 0,05g de $MnSO_4$ foi adicionado em um balão volumétrico de 100 mL, que teve o volume máximo completado com água deionizada. No preparo da solução fenol + hidróxido de sódio, adicionou-se 10g de C_6H_5OH e 2,5g de NaOH em um balão volumétrico de 100 mL, completado com água deionizada.

Além dos reagentes, utilizando-se uma solução estoque de sulfato de amônia (100 ppm), preparou-se uma curva padrão, com concentrações de 0; 0,025; 0,010; 0,075; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0 ppm, em balões volumétricos de 100 mL de volume, para possibilitar a correlação de absorbância e concentração de amônia.

Após o período de sonicação e retirada do material vegetal, alíquotas de 10 mL das soluções foram transferidas para tubos de ensaio identificados, para adição dos reagentes e posterior determinação colorimétrica. Adicionou-se uma gota da solução de sulfato de manganês; 500 μ L da solução de hipoclorito de sódio; e 600 μ L da solução fenol + NaOH. Os tubos de ensaio foram acondicionados em um agitador, por 10 min. Logo após a agitação, realizou-se a leitura da absorbância e a determinação do teor de amônia da solução, tanto das amostras quanto da curva padrão, por espectrofotometria, de acordo com métodos publicados por (Wendler et al. 1990; Dayan et al. 2015), utilizando-se um espectrofotômetro de duplo feixe UV visível (Cintra 40, GBC Scientific Equipment Ltd.), no comprimento de onda de 630 nm.

1.2.5.4 Produtividade e Massa de 100 grãos

Com relação os experimentos de campo, foram estimadas a produtividade e massa de 100 grãos. Para isso, foi realizada a colheita das espigas de duas fileiras centrais com quatro metros de comprimento, as quais foram debulhadas em trilhadora experimental e as amostras foram limpas com auxílio de peneiras e acondicionadas em sacos de papel. Partindo-se do rendimento dos grãos nas parcelas, foi estimada

a produtividade (em kg ha⁻¹), para cada tratamento e repetição. Em seguida, foi determinada a massa de 100 sementes, por meio da pesagem de oito subamostras de 100 sementes para cada repetição de campo. Para o cálculo da produtividade e massa de 100 sementes, o grau de umidade das amostras foi corrigido para 13 % base úmida.

1.2.6 Análise dos dados

Para a expressão relativa do gene *pat* foi utilizado o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), no qual a expressão relativa do gene alvo foi calculada com base na expressão do gene normalizador Folylpolyglutamate sintetase.

Os dados de cada experimento foram submetidos à análise de variância e, quando os valores de F foram significativos ($p \leq 0,05$), foi aplicado o teste de média T (LSD) ($p \leq 0,05$) e as doses, foi aplicado a análise de regressão. Ao escolher o melhor modelo de regressão, foram adotados os seguintes critérios: regressão significativa, desvios da regressão não-significativos, coeficiente de determinação, análise de resíduos e explicação biológica. Foi realizada ainda a análise conjunta dos dados dos experimentos em duplicata tanto para casa de vegetação como em campo.

Os programas utilizados foram o Sisvar[®] (versão 5,6) e Sigma plot[®] (versão 12). Para todos os parâmetros avaliados, foram calculados o intervalo de confiança (média $\pm$ Intervalo de confiança), calculado a partir da seguinte equação:

$$IC = (t \times desvpad) / \sqrt{n},$$

Onde: IC = intervalo de confiança; t = valor de t tabelado, ao nível de 5 % de probabilidade; desvpad = desvio padrão; e $\sqrt{n}$ = raiz quadrada do número de repetições.

1.3 Resultados

1.3.3 Análise de variância dos experimentos em casa de vegetação

A análise de variância demonstrou que não ocorreram diferenças significativas entre os experimentos realizados em duplicata. Assim, esses experimentos foram analisados e discutidos em conjunto. Foram encontradas diferenças significativas entre as doses de glufosinate aplicadas, porém não foi possível realizar um ajuste de

regressão de acordo com os critérios adotados para a escolha. Desta forma, quando a comparação entre as médias se fez necessário, foi utilizado o teste de média T (LSD) ($p \leq 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 - P-valor da análise de variância (ANOVA) das variáveis analisadas, nos experimentos em casa de vegetação. Botucatu – SP.

F.V.	E.R.	% degra. 2DAA	% degra. 4DAA	Massa seca	Amônia		
					2 DAA	4 DAA	15 DAA
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
D	----	0,4258	0,7429	0,0245	<0,0001	<0,0001	<0,0001
E	----	----	----	0,7513	0,7183	0,8426	0,6978
T * D	----	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0154
F.V.	Gluf. 2DAA	Gluf. 4DAA	NAG 2DAA	NAG 4DAA	Total 2DAA	Total 4DAA	
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7814	<0,0001	
D	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
E	----	----	----	----	----	----	
T * D	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
Taxa de transporte de elétrons							
F.V.	0 DAA	6 horas	1 DAA	2 DAA	3 DAA	5 DAA	8 DAA
T	0,7546	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,8315	0,7215	0,8231
D	0,8416	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,4537	0,4987	0,5617
E	0,7745	0,8951	0,9541	0,5214	0,3648	0,4571	0,5627
T * D	0,4917	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,3270	0,4578	0,5973
Injúria visual							
F.V.	0 DAA	1 DAA	2 DAA	3 DAA	7 DAA	14DAA	21 DAA
T	1,000	0,3674	0,1425	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
D	1,000	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
E	1,000	0,9841	0,8543	0,8811	0,8326	0,7129	0,5419
T * D	1,000	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Legenda: F.V.: fontes de variação; T.: tecnologias; D.: doses; E.: experimentos = E.R.: Expressão relativa; NAG: N-acetyl-L-glufosinate.

1.3.2 Expressão relativa do gene *pat*

A expressão relativa do gene *pat*, em relação ao seu normalizador Folylpolyglutamate sintetase, demonstrou que as tecnologias apresentaram diferenças entre si. A tecnologia Leptra apresentou maior expressão relativa do gene *pat*, diferindo significativamente das demais tecnologias. As menores expressões do

gene *pat* foram encontradas nas tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL, apresentando expressão relativa 90 % menor, quando comparados a tecnologia Leptra. A tecnologia Power Core apresentou a segunda maior expressão entre as tecnologias, porém apresentou expressão 60 % inferior a tecnologia Leptra (Figura 3).

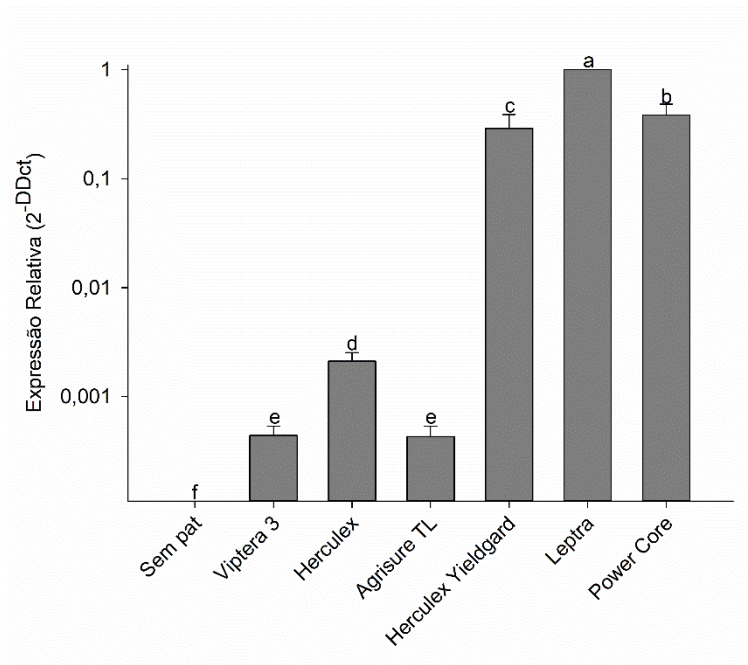


Figura 3 - Expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) do gene *pat* (fosfinotricina acetyltransferase), antes da aplicação do herbicida glufosinate em sete tecnologias de milho. Média $\pm$ intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais na coluna, entre as tecnologias, não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

1.3.3 Degradação de Glufosinate

Os teores de glufosinate, NAG e teor total de ambas as substâncias aos 2 DAA, demonstram que os teores foram proporcionais às doses de glufosinate aplicadas em cada tratamento (500 e 1000 g i.a ha⁻¹). A tecnologia sem o gene *pat*, apresentou altos níveis de glufosinate (0,39 mmol⁻¹ g⁻¹ de massa fresca) e não foram encontrados teores de NAG nessa tecnologia, em ambas as doses de glufosinate aplicadas. Já para as tecnologias com o gene *pat*, Viptera 3 e Agrisure TL apresentaram maior concentração de glufosinate e menor teor de NAG, em relação as demais tecnologias, em ambas as doses aplicadas (Figura 4AB).

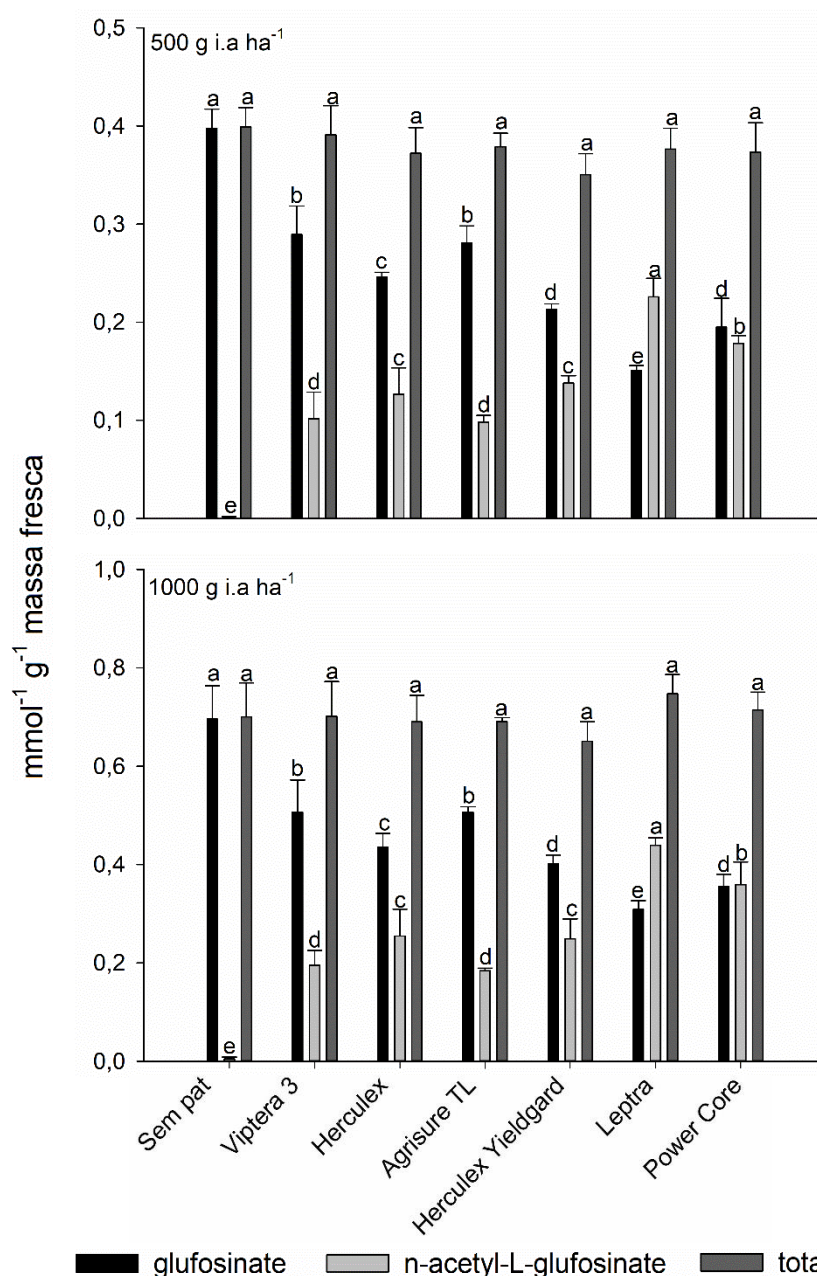


Figura 4 - Teor de glufosinate, n-acetyl-L-glufosinate (NAG) e teor total ($\text{mmol}^{-1} \text{g}^{-1}$ massa fresca), após a aplicação de glufosinate de amônio nas doses de 500 e 1000 g i.a. ha^{-1} em sete tecnologias de milho, aos 2 DAA. Média $\pm$ intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais em cada coluna, entre as tecnologias não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

A tecnologia Leptra apresentou o maior teor de NAG e menor teor de glufosinate, em ambas as doses aplicadas. Em comparação com a tecnologia Leptra, as tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL apresentaram 46 e 39 % a mais, de glufosinate e 56 e 55 % a menos, de NAG respectivamente para as doses de 500 e 1000 g i.a.

ha⁻¹ de glufosinate, aos 2 DAA. Quanto ao teor total (glufosinate + NAG), observou-se que não ocorreram diferenças entre as tecnologias, demonstrando que o método de quantificação dessas substâncias foi eficiente (Figura 4AB). Os dados de glufosinate e NAG apresentaram comportamento semelhante aos 4 DAA. Somente para o valor do teor total (glufosinate + NAG), as tecnologias com gene *pat* apresentaram valor inferior ao da tecnologia sem esse gene (Figura 5AB).

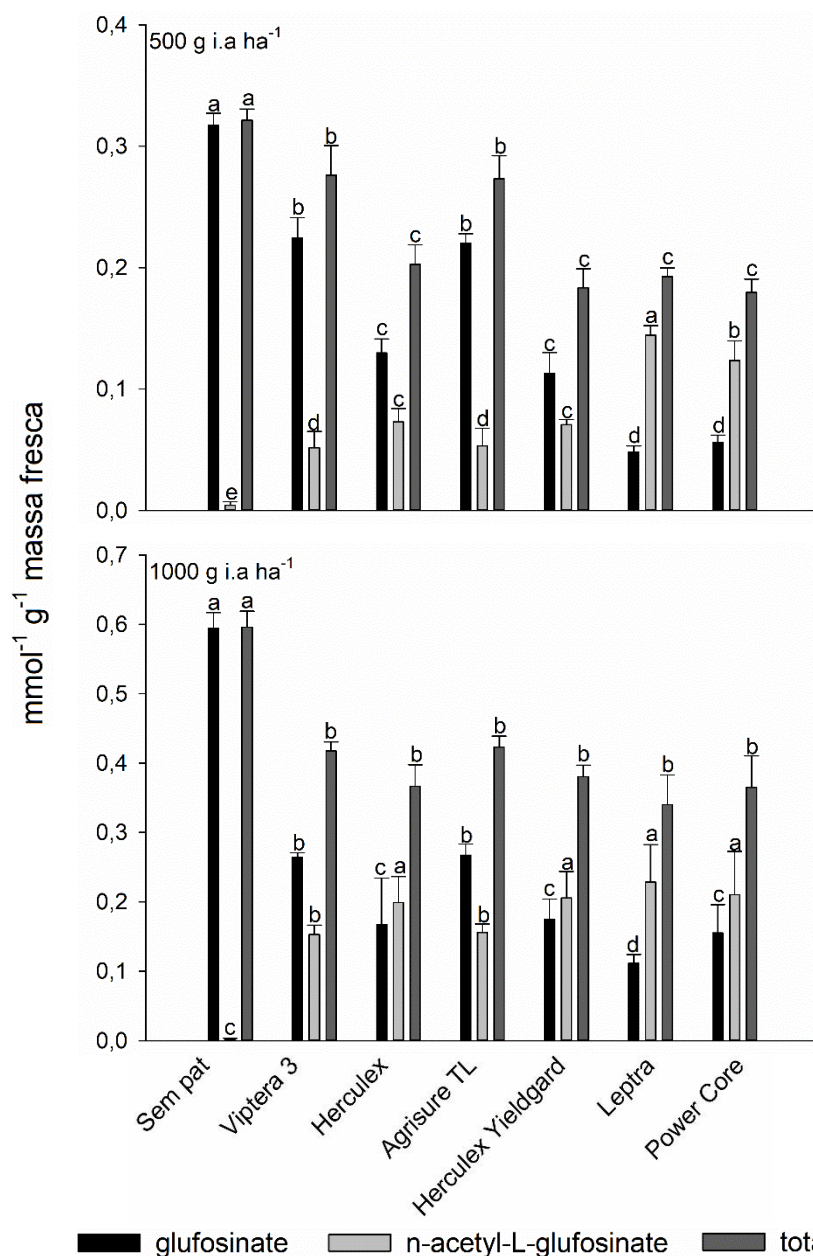


Figura 5 - Teor de glufosinate, n-acetyl-L-glufosinate (NAG) e teor total (mmol⁻¹ g⁻¹ massa fresca), após a aplicação de glufosinate de amônio nas doses de 500 e 1000 g i.a. ha⁻¹ em sete tecnologias de milho, aos 4 DAA. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais em cada coluna, entre as tecnologias não diferem entre si pelo teste t (p ≤ 0,05).

Com base nos dados de NAG e total, foram calculadas as porcentagens de degradação de glufosinate. Observou-se que a tecnologia Leptra apresentou as maiores médias de porcentagem de degradação (59 - 76%), em relação as demais tecnologias aos 2 DAA e aos 4 DAA junto com a tecnologia Power Core (48 – 68 %) aos 4 DAA, independente da dose aplicada (500 e 1000 g i.a ha⁻¹) (Figura 6 AB).

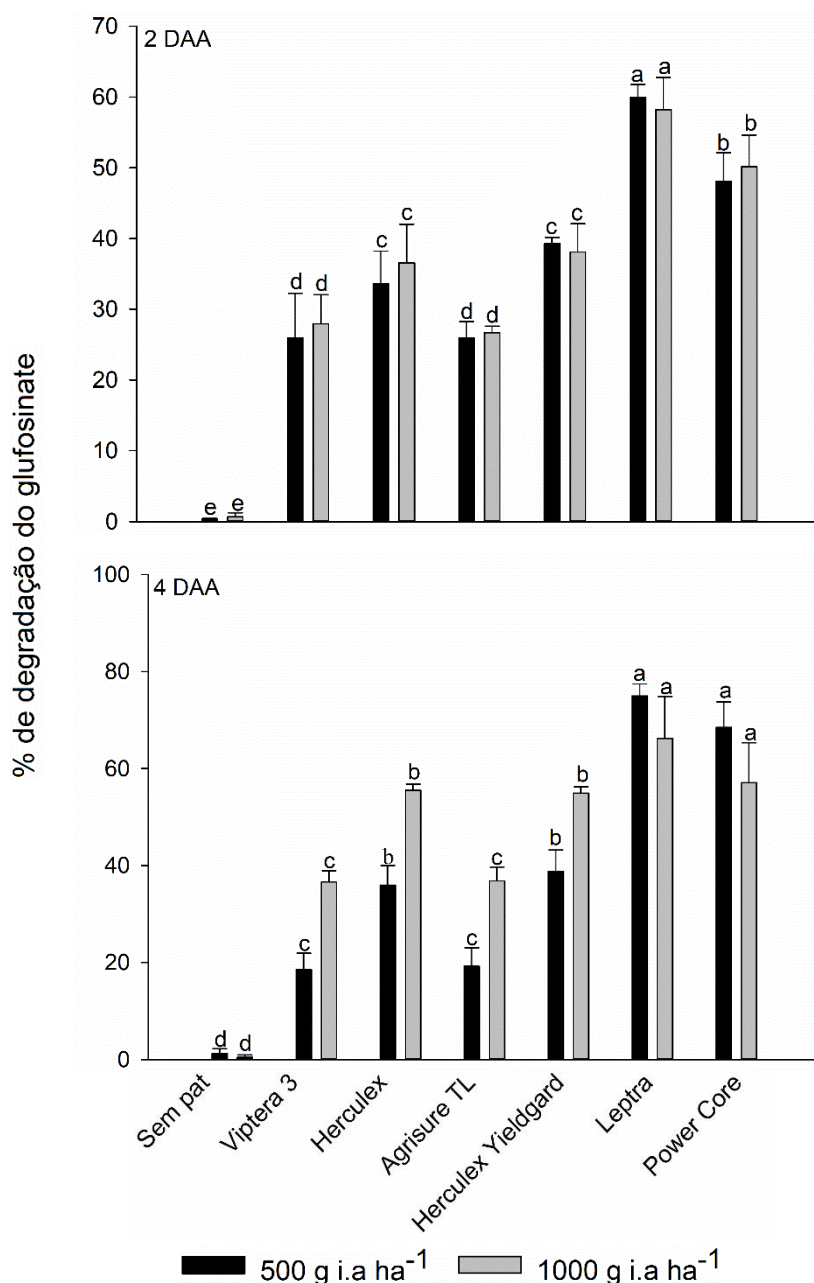


Figura 6 - Porcentagem de degradação de glufosinate (% do total encontrado), após a aplicação de glufosinate de amônio nas doses de 500 e 1000 g i.a. ha⁻¹ em sete tecnologias de milho, aos 2 e 4 DAA. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais em cada coluna, entre as tecnologias não diferem entre si pelo teste t (p ≤ 0,05).

As tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL, apresentaram as menores porcentagens de degradação de glufosinate, 25 e 27 % aos 2DAA e 18 e 36 % aos 4 DAA, respectivamente. A tecnologia sem o gene *pat*, não apresentou degradação de glufosinate em NAG (Figura 6AB).

1.3.4 Teor de amônia

Os teores de amônia variaram conforme as tecnologias após a aplicação de glufosinate, porém em todas as doses, aos 2, 4 e 14 DAA a tecnologia sem o gene *pat* apresentou os maiores teores de amônia em relação a sua testemunha, acumulando de 20 - 57 vezes mais ou de 0,15 a 9,20 mg kg⁻¹ de massa fresca, variando conforme as doses de glufosinate aplicadas (Figura 7AB). Nas tecnologias com a presença do gene *pat*, observou-se incremento dos teores de amônia com o aumento das doses aos 2 e 4 DAA. Aos 2 DAA na dose de 500 g i.a. ha⁻¹, não há diferenças entre as tecnologias (com *pat*), todas apresentando níveis de no máximo 5 vezes maior que a testemunha ou com teores em torno de 0,15 a 0,50 mg kg⁻¹ de massa fresca (Figura 7 AB). Nas demais doses, as tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL, apresentaram maiores teores de amônia em relação as demais tecnologias, variando de 7,20 a 9,02 mg kg⁻¹ de massa fresca ou 14 - 17 e 25 vezes maior que a testemunha, respectivamente para as doses de 2000 e 4000 g i.a. ha⁻¹.

Aos 4 DAA os teores de amônia reduzem de forma significativa, em relação à primeira coleta (2 DAA), somente na dose de 4000 g i.a. ha⁻¹, os teores de amônia são significativamente maiores nas tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL, em relação as demais, com acúmulo de 11 a 14 vezes maior que a testemunha (Figura 7 CD). Aos 15 DAA, as tecnologias com a presença do gene *pat* não apresentaram grande acúmulo de amônia, com exceção da tecnologia sem *pat* (Figura 7EF).

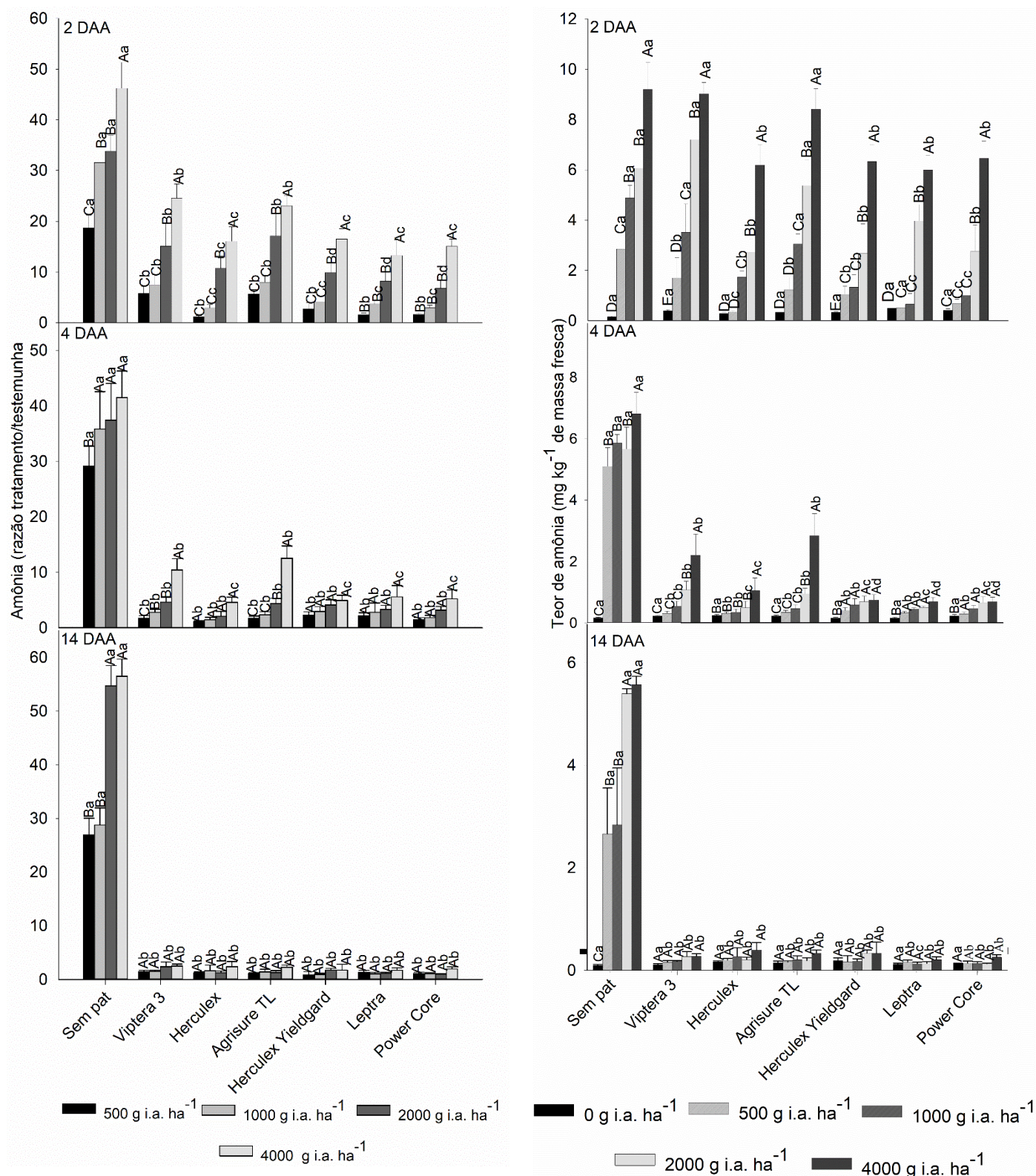


Figura 7 - Teor de amônia (mg kg⁻¹ massa fresca) e amônia razão tratamento/testemunha, aos 2, 4 e 14 DAA de glufosinate nas doses de 500, 1000, 2000 e 4000 g i.a. ha⁻¹ em sete tecnologias de milho. Média $\pm$ intervalo de confiança. Letras minúsculas (tecnologias) e maiúsculas (doses) iguais em cada coluna, não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

1.3.5 Taxa de Transporte de elétrons (ETR)

A porcentagem de ETR foi afetada de forma significativa nas plantas sem o gene *pat*, independente das doses aplicadas, com níveis próximos de 20 % em relação a testemunha as 6 horas após a aplicação e 0 % aos 8 dias após a aplicação. Entre as tecnologias com o gene *pat*, observou-se que para Vipitera 3 e Agrisure TL, todas as doses de glufosinate reduziram o ETR às 6 horas após a aplicação, para níveis de 20 %. Nessas tecnologias, o ETR retornou aos níveis normais a partir dos 2 DAA. Para as demais tecnologias com o gene *pat*, as reduções na ETR foram observadas com aplicações de doses acima de 1000 g i.a. ha⁻¹ (Figura 8).

Observou-se que para todas as tecnologias com o gene *pat*, os níveis de ETR ficaram semelhantes em relação a testemunha (próximos a 100 %), a partir do segundo dia após a aplicação (Figura 8).

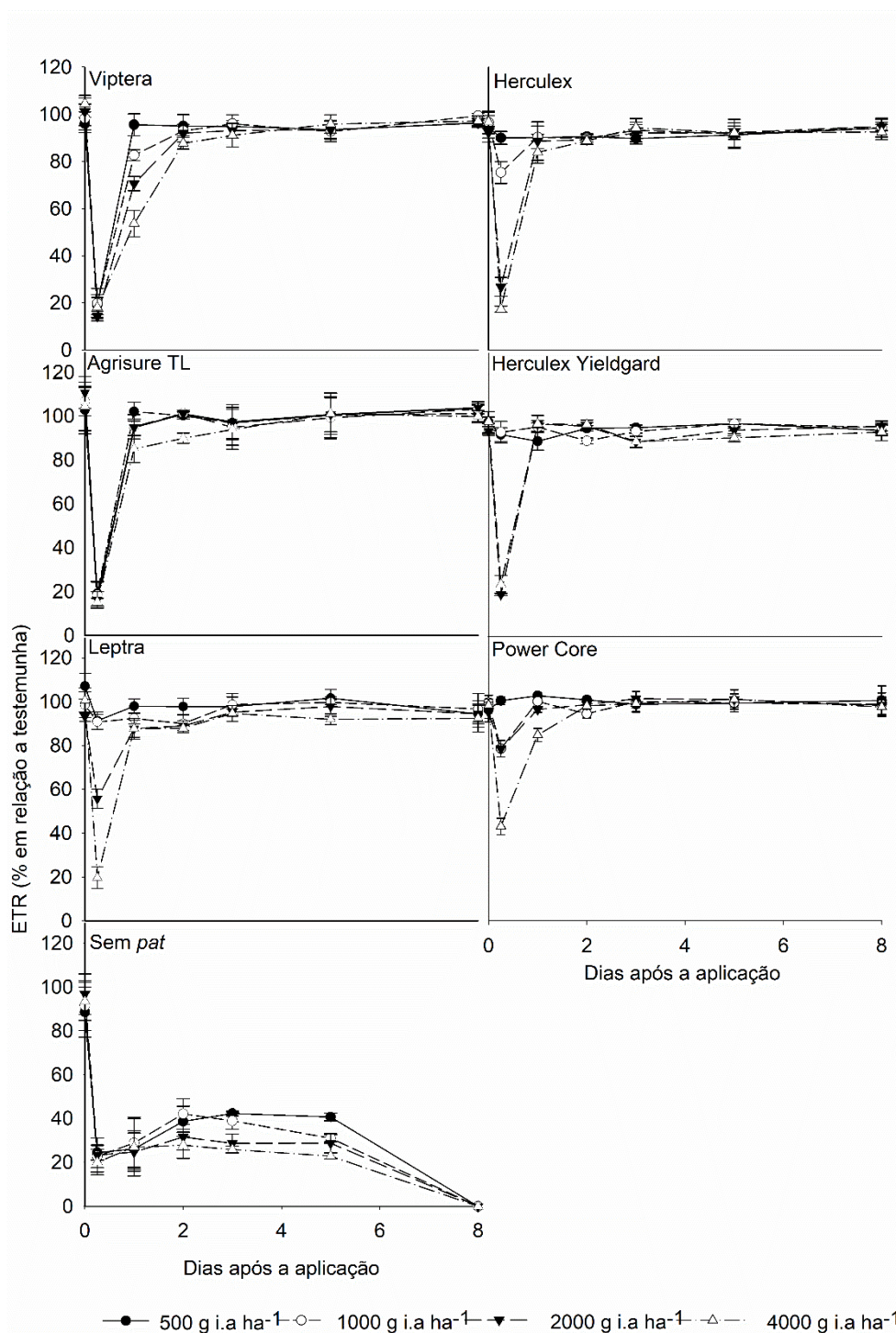


Figura 8 - Porcentagem da taxa de transporte de elétrons (ETR) das doses de glufosinate (500, 1000, 2000 e 4000 g i.a. ha⁻¹) em relação a testemunha sem aplicação, as 0 e 6 horas e 1, 2, 3, 5, 8 DAA, em sete tecnologias de milho. Média $\pm$ intervalo de confiança.

1.3.7 Injúria visual

Nas plantas sem a presença do gene *pat*, os níveis de injúria visual foram os mais altos observados, e aos 21 DAA as plantas foram consideradas mortas (100 % de injúria).

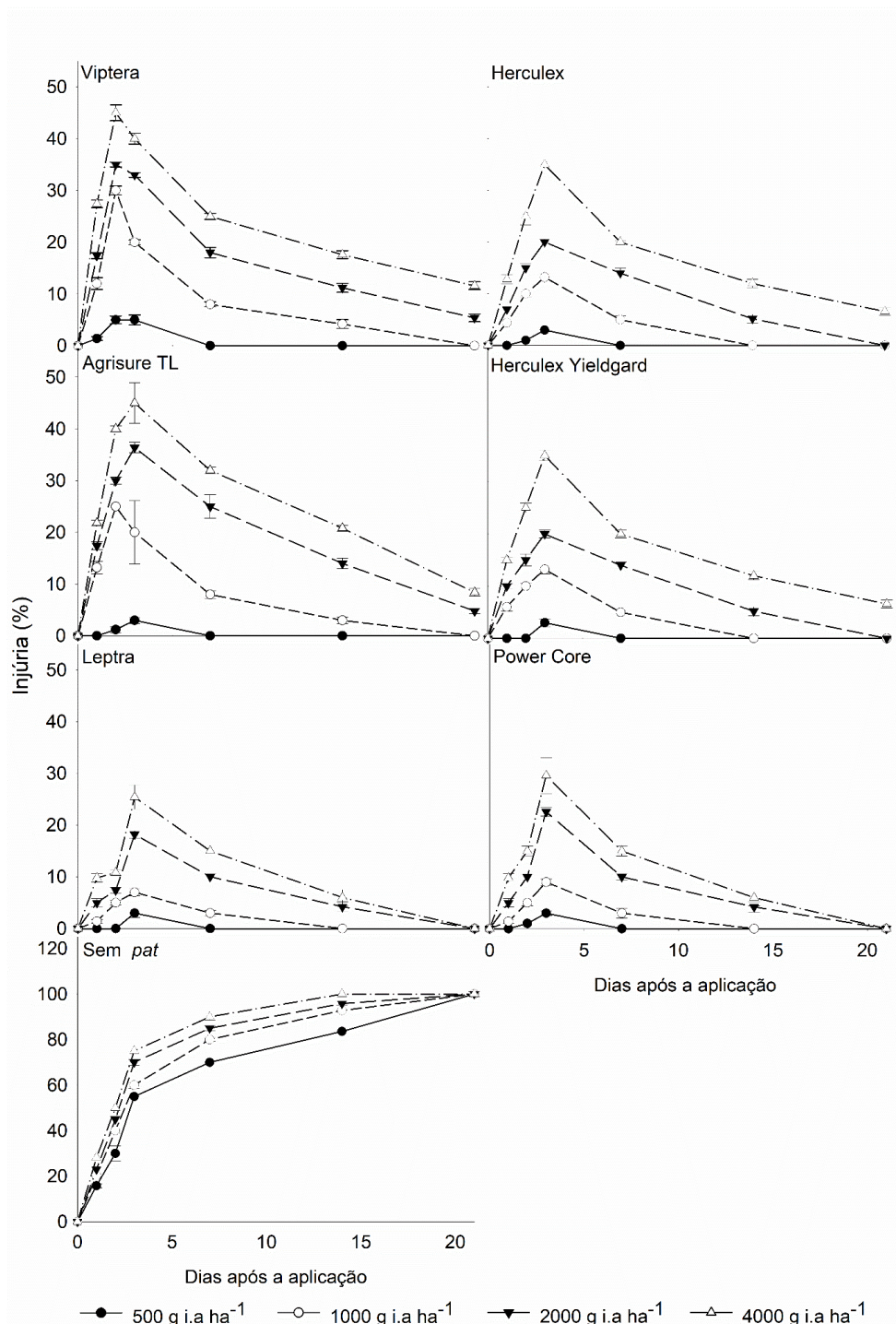


Figura 9 - Porcentagem de injúria visual das doses de glufosinate (500, 1000, 2000 e 4000 g i.a. ha⁻¹) em relação a testemunha sem aplicação, aos 0, 1, 2, 3, 7, 14 e 21 DAA, em sete tecnologias de milho. Média ± intervalo de confiança.

De maneira geral todas as tecnologias apresentaram injúria visual, e esta foi proporcional a dose aplicada (Figura 9). Entre as tecnologias com o gene *pat*, as mais afetadas foram a Viptera 3 e Agrisure TL, principalmente nas doses mais elevadas (1000, 2000 e 4000 g i.a. ha⁻¹), com injúrias acima de 30 %. Já na dose de 500 g i.a. ha⁻¹, que é a dose comercial de glufosinate, as injúrias visuais foram menos severas e semelhantes entre as tecnologias com o gene *pat*. As tecnologias Leptra e Power Core, foram as que apresentaram as menores injúrias, mesmo nas altas doses de glufosinate aplicadas, e com recuperação total das injúrias aos 21 DAA (Figura 9).

1.3.8 Massa da matéria seca

Pequenas alterações na porcentagem de massa seca em relação a testemunha foram observadas aos 28 DAA, nas tecnologias Leptra e Power Core, independente das doses aplicadas, sinalizando alta resistência dessas tecnologias ao glufosinate (Figura 10). Para as demais tecnologias com o gene *pat* (Viptera 3, Herculex, Agrisure TL e Herculex + Yieldgard) observou-se redução de 14 a 31 % para as doses de 500 e 1000 g i.a. ha⁻¹ e redução de biomassa de 25 a 45 % para as doses de 2000 e 4000 g i.a. ha⁻¹. As tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL foram as que apresentaram as reduções mais acentuadas, independente das doses aplicadas. Na tecnologia sem o gene *pat*, ocorreu 90% de redução da massa seca, em relação a testemunha, independente da dose de glufosinate aplicada (Figura 10).

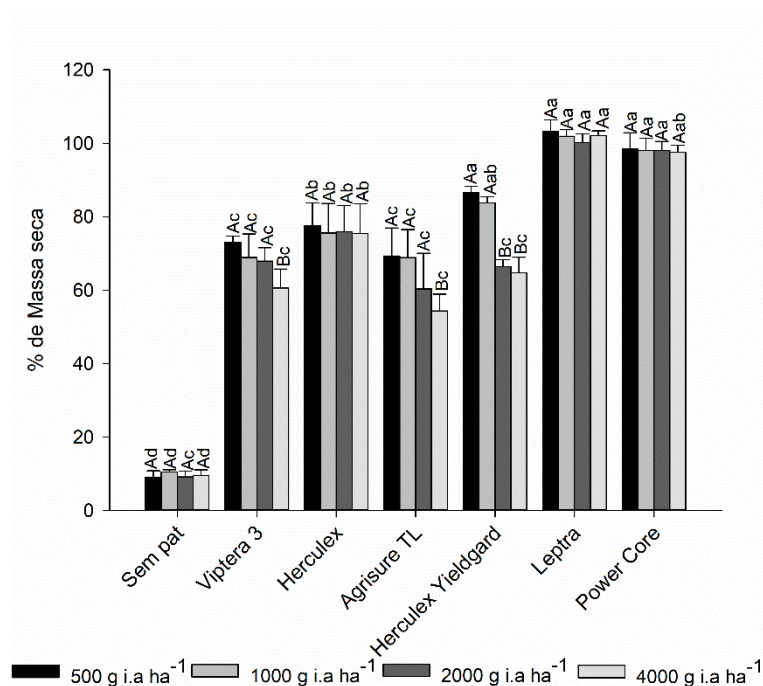


Figura 10 - Porcentagem de massa seca de plantas de milho em relação a testemunha aos 28 dias após a aplicação de glufosinate nas doses de 500, 1000, 2000 e 4000 g i.a. ha⁻¹ em sete tecnologias de milho. Média $\pm$ intervalo de confiança. Letras minúsculas (tecnologias) e maiúsculas (doses) iguais em cada coluna, não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

1.3.9 Análise de variância dos experimentos em campo

A análise de variância que não foram encontradas diferenças significativas entre os experimentos realizados em Botucatu e São Manuel - SP, desta forma esses experimentos foram analisados e discutidos em conjunto. O fator doses foi analisado somente para massa de 100 grãos e produtividade, as demais variáveis foram expressas em valores em comparação com a testemunha (Tabela 5).

Tabela 5 - P-value da análise de variância (ANOVA) das variáveis analisadas, nos experimentos de campo, em Botucatu e São Manuel - SP.

F.V.	Amônia					% ETR			
	2 DAA	4 DAA	15 DAA	0 DAA	6 horas	1 DAA	2 DAA	3 DAA	5 DAA
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7741	<0,0001	<0,001	0,4125	0,5841	0,4934
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	0,7596	0,8524	0,4795	0,8421	0,5236	0,5497	0,7541	0,6782	0,8414
T * D	<0,0001	<0,0001	0,8144	0,5962	<0,0001	<0,0001	0,7459	0,8534	0,3270

F.V.	% ETR	Injúria visual				Massa de 100	Produtividade
	8 DAA	7 DAA	14 DAA	21 DAA	grãos		
T	0,7458	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
D	---	---	---	---	<0,0001	<0,0001	
L	0,7459	0,8415	0,7361	0,5963	0,4745	0,8214	
T * D	0,8419	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

Legenda: F.V: Fontes de variação; T: Tecnologias; D: Doses; L: Local

1.3.10 Teor de amônia a campo

Os dados de amônia da dose de 500 g i.a. ha⁻¹, aplicada a campo e avaliada aos 2, 4 e 15 DAA demonstraram que a tecnologia sem o gene *pat*, apresentou maior acúmulo de amônia (17 a 40 vezes) em relação as demais tecnologias. Já as tecnologias com o gene *pat*, Vipitera 3 e Agrisure TL, apresentaram maior acúmulo de amônia em relação aos demais híbridos, aos 2 e 4 DAA. Aos 15 DAA todas as tecnologias com o gene *pat*, foram semelhantes entre si quanto ao acúmulo de amônia (Figura 11).

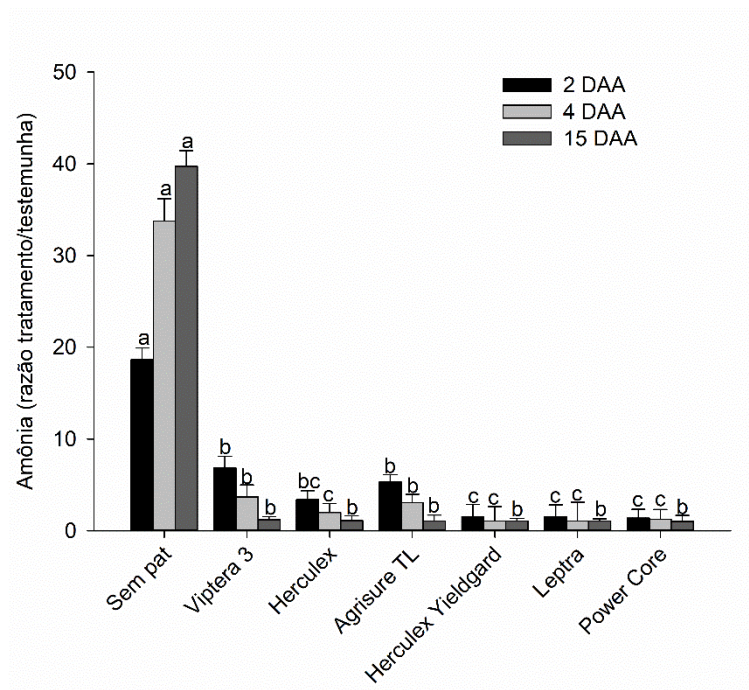


Figura 11 - Amônia razão tratamento/testemunha, aos 2, 4 e 15 dias após a aplicação de glufosinate (500 g i.a. ha⁻¹) em sete tecnologias de milho. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais dentro de cada data e entre as tecnologias não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

1.3.11 ETR a campo

A porcentagem de ETR foi reduzida para as tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL as seis horas (40-45 %) e um dia após a aplicação (12 %), em relação as demais tecnologias com o gene *pat*, porém o ETR foi normalizado a partir do segundo dia após a aplicação (próximo a 100 %), para as demais tecnologias com o gene *pat*, não observou-se, ETR afetado negativamente pela aplicação de 500 g i.a. ha⁻¹ de glufosinate. A tecnologia sem o gene *pat*, apresentou redução do ETR ao longo dos dias após a aplicação, atingindo valores próximo de zero, aos 8 DAA (Figura 13).

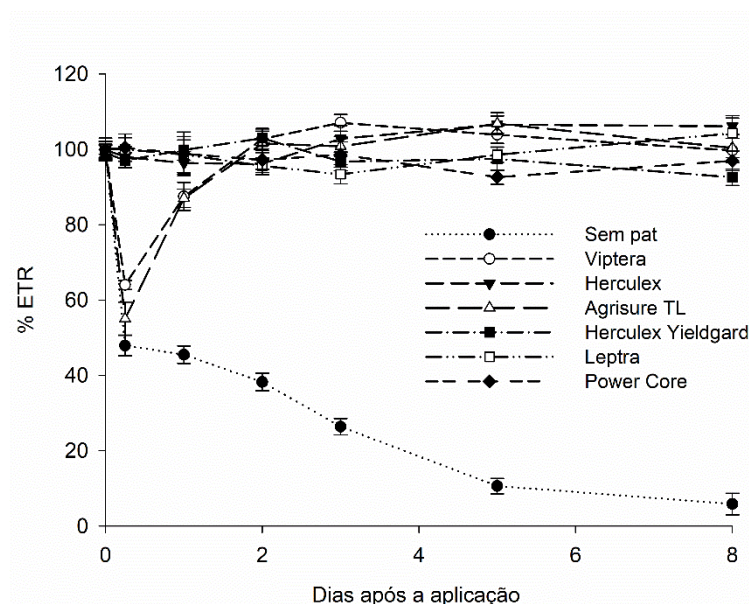


Figura 12 - Porcentagem da taxa de transporte de elétrons (ETR) da dose de 500 (g i.a. ha⁻¹) de glufosinate, em relação a testemunha sem aplicação, as 0 e 6 horas e 1, 2, 3, 5, 8 DAA, em sete tecnologias de milho. Média $\pm$ intervalo de confiança.

1.3.12 Injúria visual a campo

Leves injúrias visuais foram provocadas pela aplicação de 500 g i.a. ha⁻¹ de glufosinate nas tecnologias com a presença do gene *pat*, independente da época de avaliação, com injúrias máximas de 10 e 12 %, respectivamente para as tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL. Já para a tecnologia sem o gene *pat*, a injúria foi alta em todos os momentos avaliados, no qual aos 21 DAA as plantas apresentaram 100 % de injúria, ou seja, plantas totalmente mortas em detrimento da aplicação de glufosinate (Figura 14).

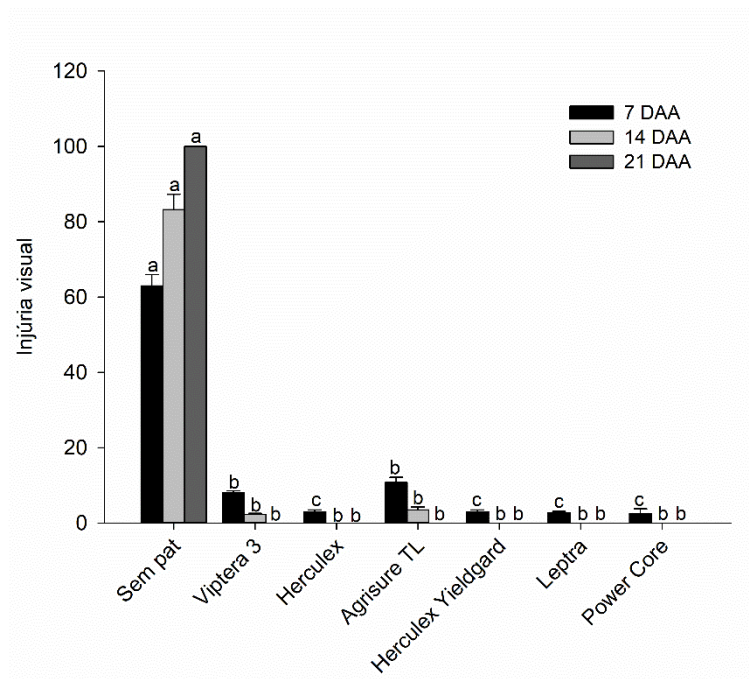


Figura 13 - Porcentagem de injúria visual da dose (500 g i.a. ha⁻¹) de glufosinate, em relação a testemunha sem aplicação, aos 7, 14 e 21 DAA, em sete tecnologias de milho (1 – sem pat; 2 – Viptera 3[®]; 3 – Herculex[®]; 4 – Agrisure TL[®]; 5 - Herculex Yieldgard[®]; 6 - Leptra[®] e 7 – Power Core[®]. Média ± intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais dentro de cada data e entre as tecnologias não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

1.3.13 Produtividade e Massa de cem grãos

Para as tecnologias com o gene *pat*, não foram observadas diferenças significativas entre a testemunha e a aplicação de 500 g i.a. ha⁻¹ de glufosinate para a massa de 100 grãos e para a produtividade. Somente na tecnologia sem o gene *pat*, a testemunha apresentou maior massa de 100 grãos e produtividade, diferindo significativamente em relação a aplicação de glufosinate, uma vez que esse tratamento resultou em morte total das plantas. No desdobramento, comparando-se as tecnologias, de maneira geral as tecnologias Viptera, Leptra e Power Core, apresentaram a maior massa de 100 grãos e produtividade em relação as demais, independente da aplicação ou não de glufosinate (Figura 14 e 15).

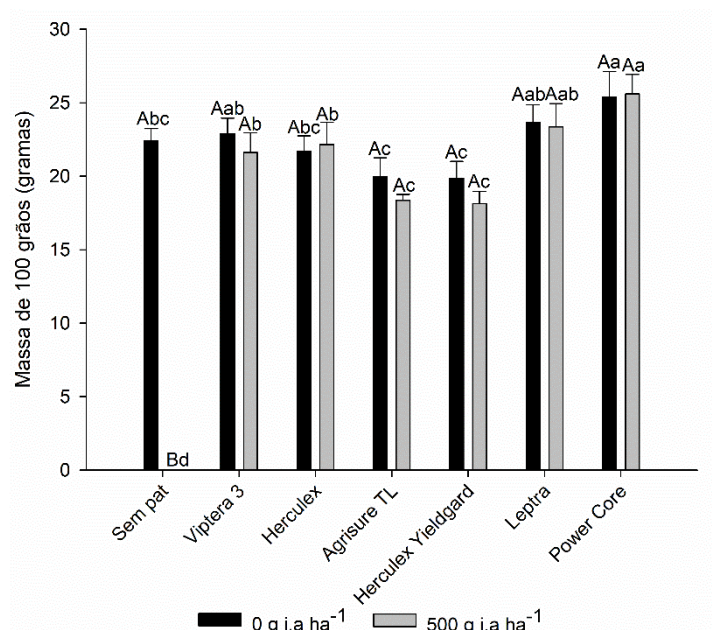


Figura 14 - Massa de 100 grãos (gramas) de plantas de milho com e sem a aplicação de glufosinate na dose 500 g i.a. ha⁻¹, em sete tecnologias de milho. Letras minúsculas iguais (entre as tecnologias) e maiúsculas iguais (entre doses dentro de cada tecnologia), não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$). Média $\pm$ intervalo de confiança.

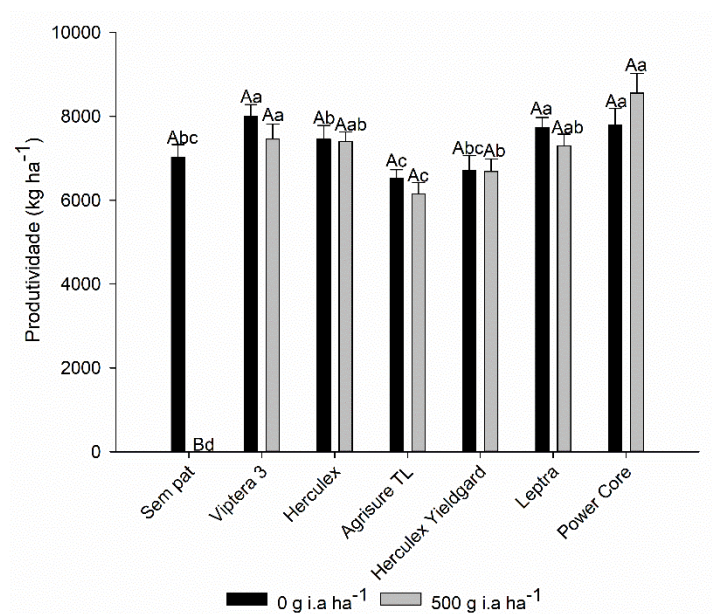


Figura 15 - Produtividade (kg ha⁻¹) de plantas de milho com e sem a aplicação de glufosinate na dose 500 g i.a. ha⁻¹, em sete tecnologias de milho. Letras minúsculas iguais (entre as tecnologias) e maiúsculas iguais (entre doses dentro de cada tecnologia), não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$). Média $\pm$ intervalo de confiança.

1.4 Discussão

No milho o gene *pat* foi inserido como marcador de seleção para genes de resistência a insetos, *cry1A(b)* (evento - Bt11) e *cry1F* (evento - TC1507), no qual ambos os genes *cry1A(b)* e *F* são fundidos ao gene *pat*. A diferença entre os eventos está no plasmídeo utilizado, no Bt11 o plasmídeo utilizado foi o pZO1502 e no TC1507 o PHI899A (CTNbio, 2016). As tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL são oriundas do evento Bt11 (Plasmídeo pZO1502) e apresentaram menor expressão do gene *pat* (Figura 3) em relação as demais tecnologias que são oriundas do evento TC1507 (Plasmídeo PHI899A), assim é possível que a mudança do plasmídeo tenha desfavorecido a expressão desse gene, nessas tecnologias.

Entretanto, observou-se diferenças de expressão do gene *pat*, dentro das tecnologias do evento TC1507, na qual as tecnologias Herculex, Herculex Yieldgard e Power Core apresentaram menor expressão do gene *pat* em relação a Leptra, esse fato pode estar relacionado ao local (região) em que o gene se encontra dentro da planta (Cui et al. 2016). Em plantas de arroz transformadas geneticamente, ocorre maior expressão do gene *pat*, quando a inserção do mesmo ocorre entre os genes da planta e uma menor expressão associada, quando o gene *pat* interrompe a sequência de um gene, e isso acarreta em maior resistência para as plantas com maior expressão do gene *pat* (Cui et al. 2016). Entre tecnologias de algodão, a tecnologia LibertyLink® (gene *bar*) apresentou maior expressão do gene, em relação a tecnologia WideStrike® (gene *pat*), em consequência a tecnologia LibertyLink® apresentou maior resistência a aplicação de glufosinate (Carbonari et al. 2016).

As plantas de milho sem o gene *pat*, não apresentam a capacidade de metabolizar o glufosinate em NAG, essa característica é presente somente em plantas com a presença dos genes *bar* e/ou *pat* (Müller et al. 2001; Dröge et al. 1994; Dröge et al. 1992), assim plantas não transformadas apresentam altos teores de glufosinate (Figura 4 e 5). Já em plantas transformadas com os genes *bar* e *pat* a degradação do glufosinate em NAG, é proporcional a expressão dos genes (Carbonari et al. 2016; Lutz et al. 2001). As tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL apresentam menor expressão do gene *pat* (Figura 3), resultando em maior teor de glufosinate e menor teor de NAG (Figura 4 e 5), quando comparadas as tecnologias Leptra e Power Core, que apresentaram as maiores expressões do gene *pat*, resultando em maior teor de NAG e menor teor de glufosinate (Figura 4 e 5).

A diminuição do teor total (glufosinate + NAG), observada aos 4DAA em relação aos 2DAA, das tecnologias com o gene *pat* em relação à sem *pat*, pode ser explicada por uma possível degradação de NAG, que também apresentou diminuição aos 4DAA (Figura 5). Uma vez que o NAG pode ser degradado pela planta (Weller et al. 2003). Outra hipótese da diminuição do teor total (glufosinate + NAG), é que as plantas de milho com o gene *pat*, também podem apresentar degradações de glufosinate (até 27 %) não ocasionadas por N - acetilação pela enzima PAT (Ruhland et al. 2004).

Quanto a degradação de glufosinate, observou-se que as porcentagens de degradação foram maiores nas tecnologias que apresentaram maior expressão do gene *pat* (Power Core – 68 % e Leptra – 74 %) (Figura 6) e consequentemente apresentaram maior teor de NAG e menor teor de glufosinate (Figura 4 e 5). O glufosinate é degradado por N - acetilação nas plantas transgênicas pela enzima PAT, em NAG (Weller et al. 2003). Em canola e milho com os gene *pat*, essa degradação pode chegar a 85 e 62 %, respectivamente, aos 3 DAA (Ruhland et al. 2004). Em plantas de milho, podem ocorrer outras formas de degradação do glufosinate, que resultam em 27 % de outros metabólitos que não NAG (Ruhland et al. 2004).

Plantas não resistentes ao glufosinate, quando pulverizadas com esse produto, apresentam aumento nos teores de amônia, como no milho sem *pat* (Figura 7), devido a ligação permanente do glufosinate com a GS (Dayan et al. 2015; Sellers et al. 2004; Coetzer e Al-Khatib, 2001; Hess, 2000). Em outras espécies não transgênicas, a aplicação de glufosinate também resulta em intenso acúmulo de amônia, como: *Ipomoea grandifolia* (Brito et al. 2017a), *Commelina benghalensis* (Brito et al. 2017b), *Bidens pilosa* (Brito et al. 2016), *Chenopodium album*, *Solanum nigrum*, *Tripleurospermum inodorum* e *Echinochloa crus-galli* (Manderscheid et al. 2005); *Abutilon theophrasti* (Sellers et al. 2004), *Amaranthus palmeri* (Coetzer e Al-Khatib 2001) e em milho (Pornprom et al., 2003).

O decréscimo dos teores de amônia dos 2DAA para os 4 DAA, nas tecnologias com o gene *pat*, se deve a rápida ação da enzima PAT na degradação do glufosinate em NAG (Figura 4, 5 e 6), que não se liga a GS e não é tóxico para a planta (Carbonari et al. 2016; Ruhland et al. 2004; Droge et al. 1994). Devido principalmente a alta expressão do gene *pat* (Figura 3) e maior metabolização do glufosinate em NAG (Figura 4 e 5), as tecnologias Leptra e Power Core apresentaram menor acúmulo de amônia, mesmo em aplicações de altas doses (Figura 7), devido a não ligação do glufosinate com a GS. Comportamentos semelhantes foram encontrados em plantas

de algodão (Carbonari et al. 2016), tabaco (Lutz et al. 2011), arroz (Tsai et al. 2006), e em beterraba açucareira (Dröge et al. 1994), modificadas com o gene *bar* e/ou *pat*, após a aplicação de doses acima de 500 g i.a. ha⁻¹.

A redução de ETR é um efeito da aplicação de glufosinate, principalmente em plantas convencionais devido a inibição da GS, acúmulo de amônia, ruptura dos cloroplastos, inibição da síntese de proteínas, especialmente Qb, que está diretamente envolvida com o transporte de elétrons na planta (Tan et al. 2006; Dayan e Zaccaro 2012; Devine et al. 1993; Kleczkowski, 1993; Sauer et al. 1987). Nas tecnologias com o gene *pat*, há redução dos efeitos inibitórios do glufosinate nas plantas (Carbonari et al. 2016; Ruhland et al. 2004; Droge et al. 1994). Como consequência, a taxa de ETR reduz nas tecnologias com o gene *pat*, porém essa redução é seguida de rápida recuperação, em comparação com a tecnologia sem o gene *pat* (Figura 8). A menor redução de ETR também foi evidenciado em plantas de algodão com gene *bar* e *pat* (Carbonari et al. 2016) e em plantas de soja com o gene *pat* (Reddy et al. 2011), quando comparadas com as suas respectivas plantas não transgênicas.

Os níveis de injúria encontrados nas tecnologias são compatíveis com a expressão do gene *pat* (figura 3), aos teores de glufosinate e NAG (Figura 4 e 5) e acúmulo de amônia (figura 7), assim tecnologias como o Viptera 3 e Agrisure TL apresentaram maior injúria em relação as demais tecnologias (Figura 9 e 13). Na cultura do algodão, a tecnologia LibertyLink® com o gene *bar* apresentou maior expressão desse gene em relação à WideStrike® com o gene *pat*, utilizado como marcador de seleção. Essa diferença de expressão resultou em menor injúria, menor acúmulo de amônia, e maior taxa de ETR para a tecnologia LibertyLink® (Carbonari et al. 2016). Em milho com o gene *pat*, também foram encontradas injúrias visuais na dose de 500 g i.a. ha⁻¹ de 4 – 6 % (Krenchinski et al. 2018; Silva et al. 2017) e injúria de 1 % com aplicação de 350 g i.a. ha⁻¹ (Armel et al. 2008).

Do ponto de vista metodológico é importante o monitoramento precoce dos teores de amônia e da ETR, com medições de até 2 DAA. Isso possibilita a observação de diferenças entre os tratamentos, principalmente em plantas que apresentam o gene *pat* ou *bar*, onde o glufosinate é metabolizado após a sua absorção.

A redução de massa da matéria seca observada aos 28 DAA, nas plantas das tecnologias Viptera 3 e Agrisure TL, pode estar relacionada com os maiores níveis de glufosinate (Figura 4 e 5), o que por sua vez provocou maior acúmulo de amônia

(Figura 7) e decréscimos maiores em ETR (Figura 8), consequentemente paralisando por mais tempo o acúmulo de biomassa da planta (Figura 10). As tecnologias Power Core e Leptra apresentaram menor teor de glufosinate, menor acúmulo de amônia e pequenas reduções de ETR (Figura 4, 5, 6 e 7) e não apresentaram redução de massa seca (Figura 10). Este fato está diretamente relacionado a maior expressão do gene *pat*, o que possivelmente aumenta o número da enzima PAT, que proporciona rápida degradação do glufosinate em NAG (Figura 4, 5 e 6), deixando a planta por menos tempo exposta ao efeito inibitório do glufosinate.

Como a tecnologia sem *pat* não é resistente ao glufosinate, ocorre drástica redução de massa seca (Figura 10), principalmente devido à presença de glufosinate, que não é metabolizado em NAG, proporcionando a ligação do herbicida com a enzima GS (Tan et al. 2006; Dayan e Zaccaro, 2012), resultando em maior acúmulo de amônia (Figura 7), redução no ETR (Figura 8) e consequentemente injúrias severas (Figura 9), levando as plantas a morte após 21 DAA. Em estudo para avaliar a suscetibilidade de híbridos de milho sem o gene *pat*, a aplicação de glufosinate também proporcionou redução drástica (80%) de massa em todos os híbridos testados (Pornprom et al. 2003).

A produtividade de grãos e a massa de 100 sementes não foram afetadas com a aplicação da dose comercial de glufosinate (500 g i.a ha⁻¹) nas tecnologias com o gene *pat*, demonstrando que apesar dos danos causados as plantas em redução de ETR (Figura 13), maior acúmulo de amônia (Figura 11), redução de massa seca (Figura 10), e injúria visual (Figura 9 e 13), os sintomas podem ser considerados transientes e desaparecem com o tempo, não comprometendo o rendimento e peso de grãos. Outros autores também não encontraram redução de produtividade na tecnologia Power Core, após a aplicação da dose de 500 g i.a ha⁻¹ (Krenchinski et al. 2018; Silva et al. 2017). Vale destacar que o milho é considerado uma cultura com elevado potencial de recuperação de danos causados por herbicidas, não acarretando em diminuição de rendimento, mesmo em situações com elevadas injúrias (Krenchinski et al. 2018, Albrecht et al. 2017; Silva et al. 2017), favorecendo o manejo de plantas daninhas nessa cultura.

Desta forma, observou-se que a resistência ao glufosinate é proporcional a expressão do gene *pat*, inserido como marcador de seleção. De maneira geral, as tecnologias estudadas nesse trabalho apresentam diferença na expressão do gene *pat*, consequentemente apresentam comportamento diferente quanto ao teor de

glufosinate, NAG, e amônia, além da taxa de transporte de elétrons, injúria visual, e massa seca aos 28 DAA, porém esses comportamentos diferentes não alteraram a produtividade de grãos, podendo assim ser recomendada a aplicação da dose comercial de 500 g i.a ha⁻¹ de glufosinate nas plantas das tecnologias com o gene *pat* como marcador de seleção, testadas nesse trabalho. Porém, doses superiores a essa quando aplicadas em campo, podem comprometer o rendimento de grãos, destacando o efeito que doses altas provocaram nas plantas de milho em casa de vegetação. Vale ressaltar que, mesmo com baixa expressão do gene *pat* (Viptera 3 e Agrisure TL), a produtividade não foi afetada, após a aplicação herbicida glufosinate a campo.

1.5 Referências

- Albrecht, A. J. P.; Albrecht, L. P.; Krenchinski, F. H.; Wobeto, K. S.; Mattiuzzi, M. D.; Eckert, C. T.; Carbonari, C. A. Assessment of Roundup Ready 2 (RR2) corn subjected to application of isolated and associated herbicides. *Aust. J. Crop Sci.* **2017**, 11, 974-981.
- Armel, G. R.; Richardson, R. J.; Wilson, H. P.; Hines, T. E. Mesotrione and glufosinate in glufosinate-resistant corn. *Weed Technol.* **2008**, 22, 591–596.
- Barnett, K. A.; Mueller, T. C.; Steckel, L. E. Glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) control in WideStrike® flex cotton. *Weed Technol.* **2012**, 26, 611–616.
- Brito, I. P.; Marchesi, B. B.; Pucci, C.; Carbonari, C. A.; Velini, E. D. Variation in the sensitivities of Hairy Beggarticks (*Bidens pilosa*) plants and their progenies to glufosinate ammonium. *Weed Sci.* **2016**, 64, 570-578.
- Brito, I. P.; Moraes, C. P.; Marchesi, B. B.; Carbonari, C. A.; Velini, E. D. Sensitivity of morningglory plants and their progenies to glufosinate ammonium. *Planta Daninha.* **2017**, 35, 1-10 a.
- Brito, I. P.; Marchesi, B. B.; Silva, I. P. F. E.; Carbonari, C. A.; Velini, E. D. Variation in the sensitivity of wandering jew plants to glufosinate ammonium. *Revista Caatinga.* **2017**, 30, 595-601 b.
- Carbonari, C. A.; Latorre, D. O.; Gomes, G. L.; Velini, E. D.; Owens, D. K.; Pan, Z.; Dayan, F. E. Resistance to glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in LibertyLink® and WideStrike® cotton. *Planta.* **2016**, 243, 925-933.
- Coetzer, E.; Al-Khatib, K. Photosynthetic inhibition and ammonium accumulation in Palmer amaranth after glufosinate application. *Weed Sci.* **2001**, 49, 454-459.
- Ctnbio. Liberação comercial de plantas de milho. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>. Acessado em: 21 mar. 2018.

Cui, Y.; Liu, Z.; Li, Y.; Zhou, F.; Chen, H.; Lin, Y. Application of a novel phosphinothricin N-acetyltransferase (RePAT) gene in developing glufosinate-resistant rice. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 1-10.

Dayan, F. E.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 4022–4034.

Dayan F.E.; Duke S.O. Natural compounds as next generation herbicides. *Plant Physiol.* **2014**, 166, 1090–1105.

Dayan, F. E.; Owens, D. K.; Corniani, N.; Silva, F. M. L.; Watson, S. B.; Howell, J. L.; Shaner, D. L. Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. *Weed Sci.* **2015**, 63, 23-63.

Dayan, F.E.; Zaccaro, M.L. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2012**, 102, 189-197.

Devine, M.; Duke, S.O.; Fedtke, C. Physiology of herbicide action. Englewood Cliffs: PTR Prentice Hall: Englewood Cliffs, New Jersey, 1993, 1, 441 pp.

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.* **1992**, 187, 142-151.

Dröge, W.; Siemeling, U.; Pühler, A.; Broer, I. The metabolites of the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate): identification, stability, and mobility in transgenic, herbicide-resistant, and untransformed plants. *Plant Physiol.* **1994**, 159-166.

Hérouet, C.; Esdaile, D. J.; Mallyon, B. A.; Debruyne, E.; Schulz, A.; Currier T.; Hendrickx, K.; Van, K. R. J.; Rouan, D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2005**, 41, 134–149.

Kleczkowski LA. Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1993**, 45, 339- 367.

Koressaar, T.; Remm, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* **2007**, 23, 1289–1291.

- Krenchinski, F. H.; Albrecht, A. J. P.; Cesco, V. J. S.; Rodrigues, D. M.; Pereira, V. G. C.; Albrecht, L. P.; Carbonari, C.A.; Victoria Filho, R. Post-emergent applications of isolated and combined herbicides on corn culture with cp4-epsps and pat genes. *Crop Prot.* **2018**, 106, 156-162.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* **2001**, 25, 402-408.
- Lutz, K. A.; Knapp, J. E.; Maliga, P. Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol.* **2001**, 125, 1585-1590.
- Manoli, A.; Sturaro, A.; Trevisan, S.; Quaggiotti, S.; Nonis, A. Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *J. Plant Physiol.* **2012**, 169, 807-815.
- Manderscheid, R.; Schaaf, S.; Mattsson, M.; Schjoerring, J. K. Glufosinate treatment of weeds results in ammonia emission by plants. *Agric., Ecosyst. Environ.* **2005**, 109, 129-140.
- Müller, B. P.; Zumdick, A.; Schuphan, I.; Schmidt, B. 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*). *Pest Manage. Sci.* **2001**, 57, 46-56.
- Pornprom, T.; Chompoo, J.; Grace, B. Glufosinate tolerance in hybrid corn varieties based on decreasing ammonia accumulation. *Weed Biol. Manage.* **2003**, 3, 41-45.
- Reddy K. N.; Zablotowicz, R. M.; Bellaloui, N.; Ding, W. Glufosinate effects on nitrogen nutrition, growth, yield, and seed composition in glufosinate-resistant and glufosinate sensitive soybean. *Int. J. Agron.* **2011**, 1-9.
- Ruhland, M.; Engelhardt, G.; Pawlizki, K. Distribution and metabolism of D/L-, L- and D-glufosinate in transgenic, glufosinate-tolerant crops of maize (*Zea mays* L ssp *mays*) and oilseed rape (*Brassica napus* L var *napus*). *Pest Manage. Sci.* **2004**, 60, 691-696.
- Sauer, H.; Wild, A.; Rühle, W. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis II. The causes of inhibition of photosynthesis. *Zeitschrift für Naturforschung.* **1987**, 42, 270-278.
- Sbcpd. Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas. SBCPD: Londrina, Brasil, 1995.

Sellers, B. A.; Smeda, R. J.; Li, J. Glutamine synthetase activity and ammonium accumulation is influenced by time of glufosinate application. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2004**, 78, 9-20.

Silva, A. F. M.; Albrecht, A. J. P.; Giovanelli, B. F.; Ghirardello, G. A.; Damião, V. W.; Albrecht, L. P.; Victória Filho, R. Seletividade de herbicidas isolados e em associações para milho RR2/LL[®]. *Revista Brasileira de Herbicidas*. **2017**, 16, 60-66.

Tan, S.; Evans, R.; Singh, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids*. **2006**, 30, 195–204.

Tsai, C. J.; Wang, C. S.; Wang, C. Y. Physiological characteristics of glufosinate resistance in rice. *Weed Sci.* **2006**, 54, 634-640.

Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T. Y. J.; Faircloth, B. C.; Remm, M.; Rozen, S. G. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 115.

Weller, M. G.; Diemer, M.; Wersching, C.; Niessner, R.; Sochor, H. Development of antibodies for the detection of N-acetyl-glufosinate. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6668-6675.

Wendler, C.; Barniske, M.; Wild, A. Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C3 and C4 plants. *Photosynth Res.* **1990**, 24, 55–61.

CAPÍTULO 2

GLUFOSINATE ASSOCIADO COM HERBICIDAS EM PÓS-EMERGÊNCIA NO MILHO COM OS GENES *CP4-EPSPS* E *PAT*¹

Resumo

Devido a possibilidade do uso de glufosinate na cultura do milho, estudos envolvendo associações desse herbicida junto a outros, são fundamentais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o controle de plantas daninhas e a seletividade de herbicidas em associação ao glufosinate em milho contendo os genes *pat* e *cp4-epsps*. Os experimentos foram realizados a campo em duas localidades, dispostos em blocos ao acaso com quatro repetições. Os tratamentos foram: glufosinate; glyphosate; glufosinate + glyphosate; glufosinate + nicosulfuron; glufosinate + atrazine; glufosinate + tembotrione; glufosinate + mesotrione; glufosinate + carfentrazone ethyl; glufosinate + bentazon; glufosinate + 2,4-D; testemunha sem capina e testemunha capinada. Foram realizadas avaliações visuais de injúria, taxa de transporte de elétrons do fotossistema II (ETR), quantificação de amônia, altura e rendimento de grãos das plantas de milho, além de controle das plantas daninhas em ambos os locais. A adoção da aplicação de glufosinate e suas associações não proporcionaram redução de produtividade quando comparada a testemunha capinada, no entanto alguns tratamentos apresentaram maiores níveis de injúria visual e acúmulo de amônia, porém sem redução de produtividade. Portanto, a associação de herbicidas com o glufosinate, pode ser uma alternativa para o controle de plantas daninhas, sem causar danos a cultura do milho que apresenta os genes *cp4-epsps* e *pat*.

Palavras-chave: Acúmulo de amônia. Fosfinotricina. Taxa de transporte de elétrons. Resistência a herbicidas. *Zea mays*.

AMMONIUM GLUFOSINATE ASSOCIATED WITH HERBICIDES IN POST-EMERGENCE MAIZE WITH THE *CP4-EPSPS* AND *PAT* GENES

Abstract

Due to the possibility of the use of ammonium-glufosinate in maize, studies involving the associations of this herbicide with others are fundamental. The objective of the present work was to evaluate the weed control and herbicide

¹ – Este capítulo foi submetido e aceito para publicação na revista Planta daninha, assim o mesmo encontra-se nas normas deste periódico.

selectivity in association with ammonium-glufosinate in corn containing the *pat* and *cp4-epsps* genes. The experiment was carried out in two locations, arranged in randomized blocks with four replicates. The treatments were: glufosinate; glyphosate; glufosinate + glyphosate; glufosinate + nicosulfuron; glufosinate + atrazine; glufosinate + tembotrione; glufosinate + mesotrione; glufosinate + carfentrazone ethyl; glufosinate + bentazon; glufosinate + 2,4-D; untreated and handweeded. We performed visual injury, electron transport flow from photosystem II (ETR), ammonia quantification, plant height and corn grain yield, as well as weed control at both sites. The application of glufosinate and its associations did not provide a reduction in yield when compared to handweeded. Some treatments presented higher levels of visual injury and ammonia accumulation, but without reduction of productivity. Therefore, the herbicide mixture with glufosinate may be an alternative to weed control, without damaging the corn crop that presents the *cp4-epsps* and *pat* genes.

Keywords: Accumulation of ammonia. Phosphinothricin. Electron Transport Rate. Herbicide resistance. *Zea mays*.

2.1 Introdução

O milho apresenta grande importância no cenário da agricultura brasileira. Foram semeados na última safra 17 milhões de hectares, com produção estimada de 91 milhões de toneladas e produtividade média de 5 mil kg ha⁻¹, na safra de 2017/18 para a primeira e segunda safra (Conab, 2018). Para o sucesso da cultura do milho no Brasil, a transgenia vem demonstrando papel relevante. Nos últimos 10 anos, foram liberados mais de 40 eventos transgênicos dentre tecnologias que garantem tanto resistência a insetos, como a herbicidas.

Existe uma série de fatores que podem prejudicar a produção da cultura do milho, sendo um dos mais importantes a interferência de plantas daninhas, que podem causar perdas de 13 a 88 % no rendimento do milho (Dan et al., 2010). Diante desse cenário, o milho geneticamente modificado apresenta eventos que garantem a resistência aos herbicidas glyphosate, glufosinate, 2,4-D e haloxyfop – methyl, otimizando o controle das plantas daninhas.

O herbicida glufosinate é proveniente da fosfinotricina, uma toxina isolada a partir dos fungos *Streptomyces viridochromogenes* e *Streptomyces hygroscopicus* (Dayan et al., 2009; Dayan e Duke, 2014). É um herbicida não seletivo e atua inibindo a atividade da enzima glutamina sintetase (GS) que exerce a função de desintoxicação da amônia e produção do aminoácido glutamina (Barnett et al., 2012). Plantas suscetíveis ao glufosinate, apresentam deficiência de glutamina, intoxicação pelo acúmulo de amônia, glutamato e glioxalato, além da ruptura da estrutura de cloroplastos, assim como diminuição do ETR e inibição da fotossíntese (Dayan et al., 2015; Carbonari et al., 2016; Devine et al., 1993; Coetzer e Al-Khatib, 2001).

A resistência da cultura do milho ao glufosinate está atrelada à inserção do gene *pat*, proveniente de *Streptomyces viridochromogenes*, que quando transcrito na planta produz a enzima phosphinothricin acetyltransferase (PAT) que tem a capacidade de inativar quimicamente o herbicida glufosinate em N-Acetyl- L-glufosinate (Droge-Laser et al., 1994), que não gera a insensibilidade da GS (Hérouet et al., 2005; Tan et al., 2006). O gene *pat* foi utilizado a fim de servir como marcador seletivo na cultura do milho, com sua expressão associada aos genes de resistência a insetos. Porém, nessa condição, o herbicida glufosinate pode ser utilizado no milho sem danos significativos a produtividade da cultura (Silva et al., 2017; Armel et al., 2008).

Um problema na adoção do milho geneticamente modificado resistente a herbicidas é o seu uso indiscriminado, pois moléculas como o glyphosate e glufosinate apresentam amplo espectro de ação e alta eficiência no controle de plantas daninhas. Por sua vez, o uso excessivo desses herbicidas em sucessivas safras de um ambiente agrícola pode resultar em seleção de plantas daninhas resistentes. Segundo López-Ovejero et al. (2006) a seleção de plantas daninhas resistentes a herbicidas nas culturas agrícolas tanto no âmbito nacional como internacional é um dos principais problemas relacionados ao controle de plantas daninhas. Nesse contexto, a associação de herbicidas tem grande potencial de utilização devido principalmente ao aumento no espectro de controle, inclusive de plantas daninhas que já apresentam resistência ou tolerância aos herbicidas, e consequentemente auxiliando na redução da expansão e prevenção da resistência (Owen e Zelaya, 2005).

A associação de herbicidas vem sendo estudada na cultura do milho, principalmente com o herbicida glyphosate em associações com nicosulfuron, atrazine, 2,4 D, bentazon, tembotrione, ou entre associações destes últimos herbicidas (Vieira Junior et al., 2015; Osório et al., 2015; Rezende et al., 2014 e Jakelaitis et al., 2007). Armel et al. (2008) avaliaram o efeito da associação do glufosinate com mesotrione e Silva et al. (2017) avaliaram a associação glufosinate com glyphosate e atrazine, ambos em milho contendo o gene *pat*, e não encontraram perdas significativas de produtividade.

Tendo em vista que são escassos os estudos sobre associações de herbicidas com glufosinate no controle de plantas daninhas na cultura do milho e devido à disponibilidade comercial de tecnologias que permitem a aplicação deste herbicida, novas pesquisas devem ser realizadas com o uso de glufosinate de amônio em associação com outros herbicidas na cultura do milho com o gene *pat*. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o controle de plantas daninhas e a seletividade de herbicidas em associação ao glufosinate em milho contendo os genes *pat* e *cp4-epsps*.

2.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos a campo em dois locais: Botucatu – SP (22°50'38.7"S 48°25'29.2"W) e São Manuel – SP (22°46'21.6"S 48°34'07.9"W). As características químicas de cada solo são apresentadas na Tabela 1. Foi realizada a calagem anteriormente a semeadura do milho com o objetivo de elevar o V% para 60 e em seguida uma gradagem pesada. No momento da semeadura, foi realizada uma adubação envolvendo a formulação 08-28-16 de NPK, em ambos os locais. A calagem e a adubação foram realizadas de acordo com as recomendações obtidas na interpretação da análise de solo.

Tabela 1 - Características químicas e físicas do solo da área experimental de Botucatu e São Manuel - SP.

Propriedades Químicas										
Local	pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%
	CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	mmol _c /dm ³						
Botucatu	5,1	21	21,6	1	4.3	30	13	48	98	59
São Manuel	4,9	5	27	1	3,4	15	6	25	37	50
Propriedades Físicas										
Local	Areia	Silte	Argila	Textura						
	g kg ⁻¹									
Botucatu	195	278	527	Argiloso						
São Manuel	844	39	117	Arenoso						

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. Os tratamentos com os herbicidas, suas respectivas doses e produtos comerciais estão representados na Tabela 2. Foi utilizado o híbrido simples de milho 2A401 da empresa Dow AgroSciences, que apresenta os genes Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F que conferem resistência a insetos (Milho Power core®), e apresenta resistência aos herbicidas glyphosate e glufosinate devido à presença dos genes *cp4-epsps* e *pat*. Em ambas as localidades, o híbrido foi semeado na densidade de 60 mil sementes ha⁻¹, em espaçamento de 0,85 metros entre linhas. As sementes foram tratadas com a mistura comercial de piraclostrobina + fipronil (Standak Top®) na dose de 200 ml para cada 100 kg de sementes. Durante o ciclo da cultura, não foi necessário realizar o manejo de pragas e doenças.

Tabela 2 - Tratamentos utilizados nos experimentos de milho, Botucatu e São Manuel - SP.

Herbicidas	Doses (g i.a ha ⁻¹)	Nome comercial
glufosinate	500	Finale
glyphosate	960*	Roundup Ready
glufosinate + glyphosate	500 + 960*	Finale + Roundup Ready
glufosinate + nicosulfuron	500 + 60	Finale + Sanson
glufosinate + atrazine	500 + 2400	Finale + Primóleo
glufosinate + tembotrione	500 + 100	Finale + Soberan
glufosinate + mesotrione	500 + 192	Finale + Callisto
glufosinate + carfentrazone – ethyl	500 + 30	Finale + Aurora
glufosinate + bentazon	500 + 720	Finale + Basagran
glufosinate + 2,4-D	500 + 1005*	Finale+ DMA806
testemunha sem capina	-----	-----
testemunha capinada	-----	-----

*: gramas de equivalente ácido por hectare (g e.a ha⁻¹)

A aplicação dos tratamentos foi realizada no estágio fenológico V4 do milho, utilizando pulverizador costal pressurizado a CO₂, com pressão constante de 2 BAR (ou 29 PSI), vazão de 0,65 L min.⁻¹, equipado com barra contendo 6 bicos com espaçamento de 50 cm com pontas do tipo jato plano e modelo XR 110.02 (Teejet). A pulverização foi realizada a uma altura de 50 cm do alvo em velocidade de 1 m.s⁻¹ e com volume de calda de 200 l ha⁻¹. As condições meteorológicas no momento da aplicação para temperatura foram de 26 e 27°C, umidade relativa do ar de 60 e 56 % e velocidade do vento de 1,22 e 1,41 Km h⁻¹, para a aplicação em Botucatu e São Manuel, respectivamente. Os dados meteorológicos de temperatura máxima e mínima e precipitação obtidos durante a condução dos experimentos estão descritos na Figura 1.

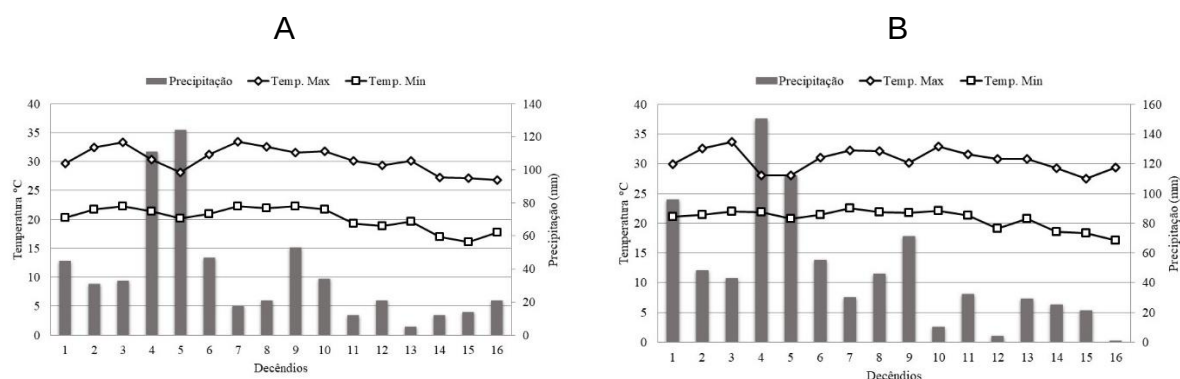


Figura 1 - Representação da precipitação, temperatura média mínima e temperatura média máxima para o período referente a safra de 2016/17 os municípios de Botucatu – SP (A) e São Manuel – SP (B). Fonte: Fazenda experimental de São Manuel e Fazenda experimental Lageado – UNESP.

Foi realizado um levantamento das plantas daninhas nos locais, através do método do quadrado inventário, e se verificou a infestação de nabiça (*Raphanus raphanistrum*), tiririca (*Cyperus rotundus*), capim papuã (ou marmelada) (*Urochloa plantaginea*) e poaia branca (*Richardia brasiliensis*), nas densidades de 12 e 20, 23 e 33, 6 e 17 e 14 e 6 plantas m², respectivamente para cada planta daninha nos experimentos instalados nos municípios de Botucatu e São Manuel. Após a avaliação de controle, as parcelas foram mantidas livres da interferência com plantas daninhas.

Durante o experimento, foram realizadas as avaliações das seguintes variáveis: controle de plantas daninhas; injúria visual, ETR, quantificação de amônia nas plantas, altura e rendimento de grãos das plantas de milho.

Para a avaliação de controle de plantas daninhas, foi atribuída uma nota visual de controle de acordo com uma escala de 0 a 100 % de controle, onde a nota 0 % foi atribuída quando não havia controle e a nota 100 % quando as plantas estavam todas mortas (SBCPD, 1995), esta avaliação foi realizada aos 28 dias após a aplicação (DAA). A avaliação de injúria visual nas plantas do milho foi realizada aos 7 e 14 DAA, utilizando a mesma escala de notas. A avaliação de altura de plantas do milho foi realizada aos 14 DAA e no estágio R6 (Maturidade fisiológica), com auxílio de régua graduada, medindo-se da superfície do solo até a última folha aberta no cartucho da planta para a altura inicial e até a base do pendão em R6.

A avaliação de ETR no fotossistema II, foi realizada as 3 horas, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 dias após a aplicação nas plantas de milho por meio de um fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS5p – Opti Sciences), com leituras realizadas em três pontos da folha mais jovem, totalmente expandida em seis plantas de cada parcela. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação a testemunha capinada (considerada como 100 %).

A amônia foi quantificada pelo método colorimétrico (Dayan et al. 2015; Wendler et al. 1990). Foram coletadas quatro folhas totalmente expandidas por planta, para compor uma amostra por parcela. As amostras foram acondicionadas em recipientes com 300 ml com água acidificada com ácido clorídrico (pH 3,5) e foram submetidas a um banho de ultrassom por 60 minutos. O conteúdo de amônia presente na solução foi determinado utilizando o espectrômetro (Cintra 40, GBC Scientific Equipment Ltd.), em comprimento de onda de 630 nm, essa análise foi realizada aos 2 e 4 DAA e os dados expressos em mg kg^{-1} de matéria fresca. Foi então calculada a razão amônia dos tratamentos com relação a amônia da testemunha capinada.

O rendimento de grãos foi mensurado colhendo-se as espigas de duas fileiras centrais com quatro metros de comprimento, as quais foram debulhadas em trilhadora experimental e as amostras limpas com auxílio de peneiras e acondicionadas em sacos de papel. Pelo rendimento dos grãos nas parcelas, foram estimadas as produtividades em kg ha^{-1} , para cada tratamento e repetição. O grau de umidade foi corrigido para 13 % (base úmida).

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O intervalo de confiança foi calculado para cada média (Média $\pm$ intervalo de confiança) de todas as variáveis analisadas. Foi também realizada a análise conjunta entre os locais de realização dos experimentos.

2.3 Resultados e discussão

Não foram encontradas diferenças significativas entre os locais para as variáveis controle de plantas daninhas *Raphanus raphanistrum*, *Cyperus rotundus*, *Urochloa plantaginea*, *Richardia brasiliensis*, injúria visual aos 7 e 14

DAA, altura de plantas 14 DAA, altura em R6 e amônia aos 2 e 4 DAA. Desta forma, os dados foram analisados e discutidos em conjunto para ambos os experimentos. Para os dados de ETR as 3 horas, 1, 2, 3, 5 e 7 DAA e produtividade, ocorreram diferenças entre os locais (*P-value*: 0,0412; 0,0314; 0,0447; 0,0125; 0,0214; 0,0047 e 0,0128, respectivamente para as variáveis acima listadas) e foram discutidos separadamente.

A injúria visual das plantas de milho foi mais acentuada para algumas associações de herbicidas aos 7 e 14 DAA, em relação as aplicações isoladas de herbicidas. As associações de glufosinate + carfentrazone – ethyl, glufosinate + bentazon e glufosinate + 2,4-D foram as que provocaram maiores injúrias (Figura 2A). A injúria visual ocasionada por essas associações de herbicidas pode ser comprovada pela maior concentração de amônia aos 2 e 4 DAA (Figura 2) quando comparado com a testemunha e demais tratamentos. Tal fato possivelmente pode estar relacionado com um sinergismo que aumentou a absorção do glufosinate, ou de ambos herbicidas na associação.

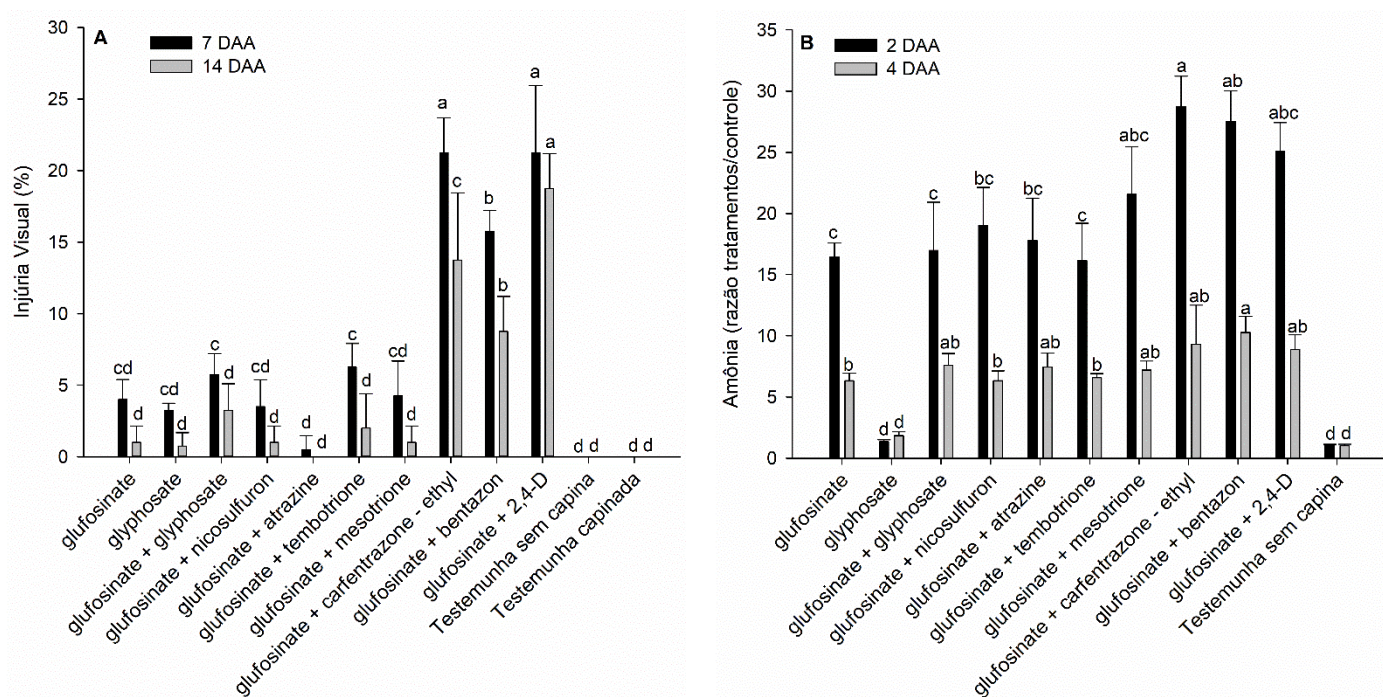


Figura 2 - Injúria visual de plantas de milho aos 7 e 14 dias (A) (CV %: 9,24 e 8,70) e Amônia (razão tratamentos/testemunha capinada) aos 2 e 4 dias após a aplicação de herbicidas (B) (CV %: 13,19 e 19,33) em pós-emergência, Botucatu e São Manuel – SP, na safra 2016/17. Médias $\pm$ Intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais entre as colunas de mesma cor não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As associações de glufosinate + carfentrazone – ethyl, glufosinate + bentazon e glufosinate + 2,4-D provocaram aumento na concentração de amônia em relação a testemunha na ordem de 28, 27 e 25 vezes aos 2 DAA e 9, 10 e 8 vezes para os 4 DAA, respectivamente (Figura 2). Todos os tratamentos aplicados com glufosinate apresentaram maior acúmulo de amônia em relação a testemunha sem capina (razão tratamento/testemunha capinada) e a aplicação de glyphosate (Figura 2), como consequência da inativação da GS após a aplicação desse herbicida, o que causa paralização da metabolização da amônia (Manderscheid et al., 2005). Como o híbrido de milho utilizado apresenta o gene *pat*, as moléculas do herbicida glufosinate tendem a ser rapidamente degradadas em N-Acetyl- L-glufosinate (Carbonari et al., 2016; Rojano-Delgado et al., 2013), garantindo a atividade da GS e diminuindo a intoxicação das plantas pela amônia. Observou-se aos 4 dias após a aplicação, que os teores de amônia diminuem em relação aos 2 DAA (Figura 2B). A redução nos teores de amônia alguns dias após a aplicação do glufosinate também foi observada em algodão, trigo e batata doce transformados com o gene *pat* (Carbonari et al., 2016; Rojano-Delgado et al., 2013 e Shin et al., 2011).

Um efeito da aplicação de glufosinate é a diminuição de ETR. Nos experimentos conduzidos em Botucatu e São Manuel (Figura 3), a ETR foi afetada significativamente pela associação de glufosinate + bentazon 3 horas após a aplicação, diferindo significativamente dos demais tratamentos. O herbicida bentazon inibe o transporte de elétrons no fotossistema II (Nimbal et al., 1996), com isso ocorre um rápido decréscimo em ETR, e essa redução também é relatada em outras espécies (Araldi et al., 2015; Macedo et al., 2008). Houve rápida recuperação dos níveis de ETR nessa associação (glufosinate + bentazon), e com 1 DAA os níveis estavam próximos dos demais tratamentos (Figura 3B), isso devido ao herbicida bentazon não ocasionar danos substanciais aos tilacóides (Macedo et al., 2008) e também pela rápida degradação do glufosinate pela enzima PAT (Carbonari et al., 2016).

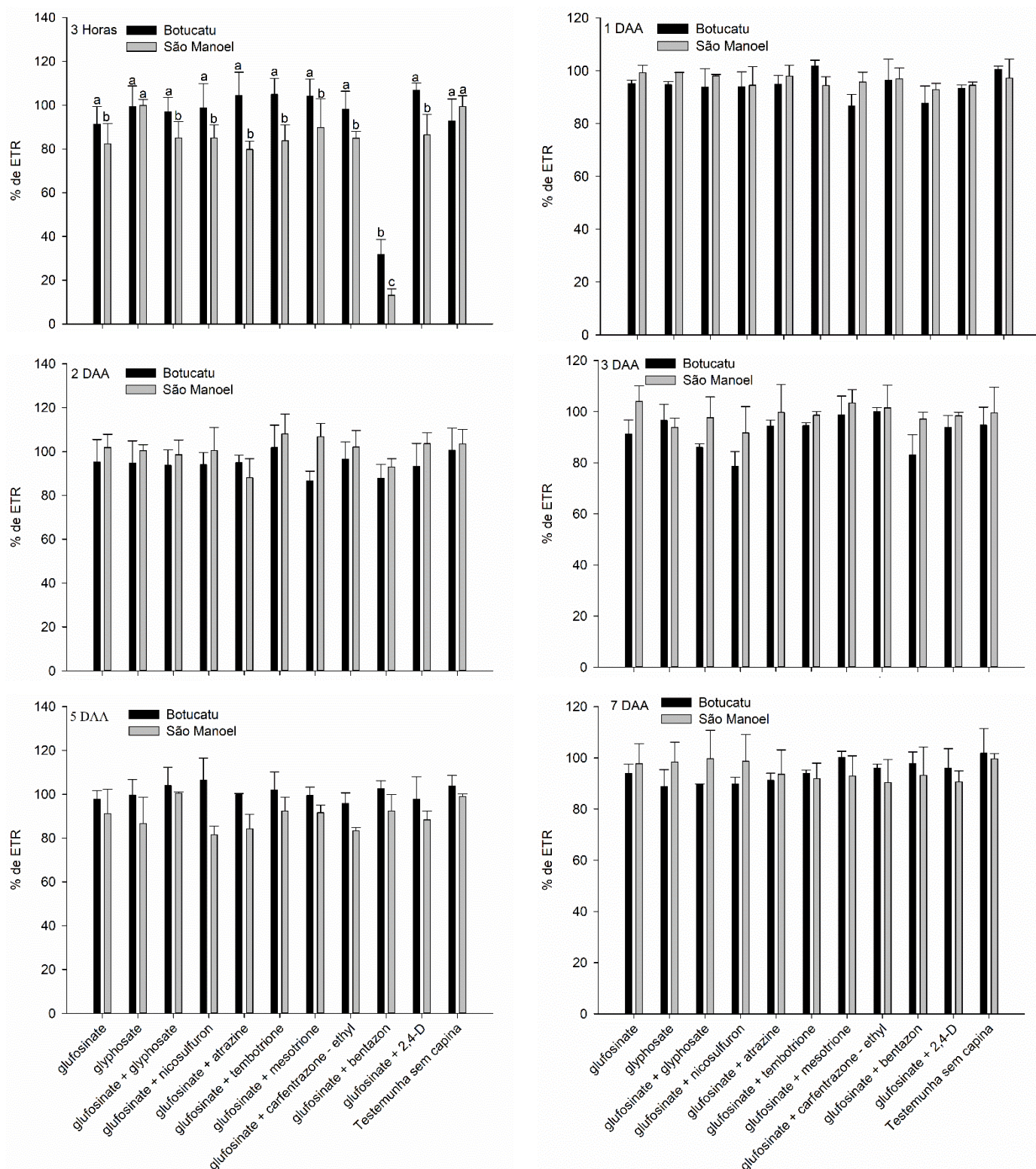


Figura 3 - Taxa de transporte de elétrons (% ETR) em relação a testemunha capinada, as 3 horas (CV %: 7,89), 1 (CV %: 10,01), 2 (CV %: 8,32), 3 (CV %: 10,47), 5 (CV %: 6,10) e 7 (CV %: 4,17) dias após a aplicação de herbicidas em pós-emergência, Botucatu e São Manoel – SP, na safra 2016/17. Médias $\pm$ Intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais entre as colunas de mesma cor

não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), gráficos sem letras foram não significativos.

De maneira geral, os valores de porcentagem de ETR para o experimento em Botucatu (Figura 3) foram próximos a testemunha capinada (100 %). Já para o experimento conduzido em São Manuel foram encontradas diferenças significativas às 3 horas após a aplicação, no qual todos os tratamentos com a aplicação de glufosinate ocasionaram diminuição de cerca de 20 % (exceto glufosinate + bentazon) em relação a testemunha capinada e diferiram significativamente da testemunha não capinada e do herbicida glyphosate (Figura 3A). Nas avaliações posteriores (1, 2, 3, 5 e 7 DAA) não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e também valores muito abaixo da testemunha capinada. Como a degradação do glufosinate pela enzima PAT é rápida, a exemplo de trigo, no qual os metabólitos da degradação são encontrados 24 horas após a aplicação em plantas com o gene *pat* (Rojano-Delgado et al., 2013) e 100 % de degradação em algodão com o gene *pat* (Carbonari et al., 2016), a recuperação dos níveis de ETR acompanha a mesma velocidade.

A aplicação dos herbicidas não causou redução de altura das plantas de milho aos 14 DAA, com isso não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos (Figura 4). Para a variável altura no estágio de maturidade fisiológica (R6), somente a testemunha não capinada apresentou redução significativa e diferiu dos demais tratamentos (Figura 4A). A interferência com as plantas daninhas também causou diminuição de produtividade em ambas as áreas de realização do experimento (Figura 5), no qual a testemunha sem capina diferiu significativamente dos demais tratamentos. Em comparação a testemunha capinada, a interferência de plantas daninhas diminuiu a produtividade em 17 e 20 % respectivamente para Botucatu e São Manuel. Com a interferência da planta daninha *U. plantaginea*, o milho apresentou produtividade 62 % inferior em relação aos tratamentos com controle dessa planta (Galon et al., 2010). Dan et al. (2010) destaca que as plantas daninhas podem causar perdas de 13 a 88 % no rendimento do milho. A diferença de produtividade entre os locais pode ser explicada pela menor fertilidade do solo na área de São Manuel (Tabela 1), haja vista que as condições meteorológicas dos locais são semelhantes (Figura 1).

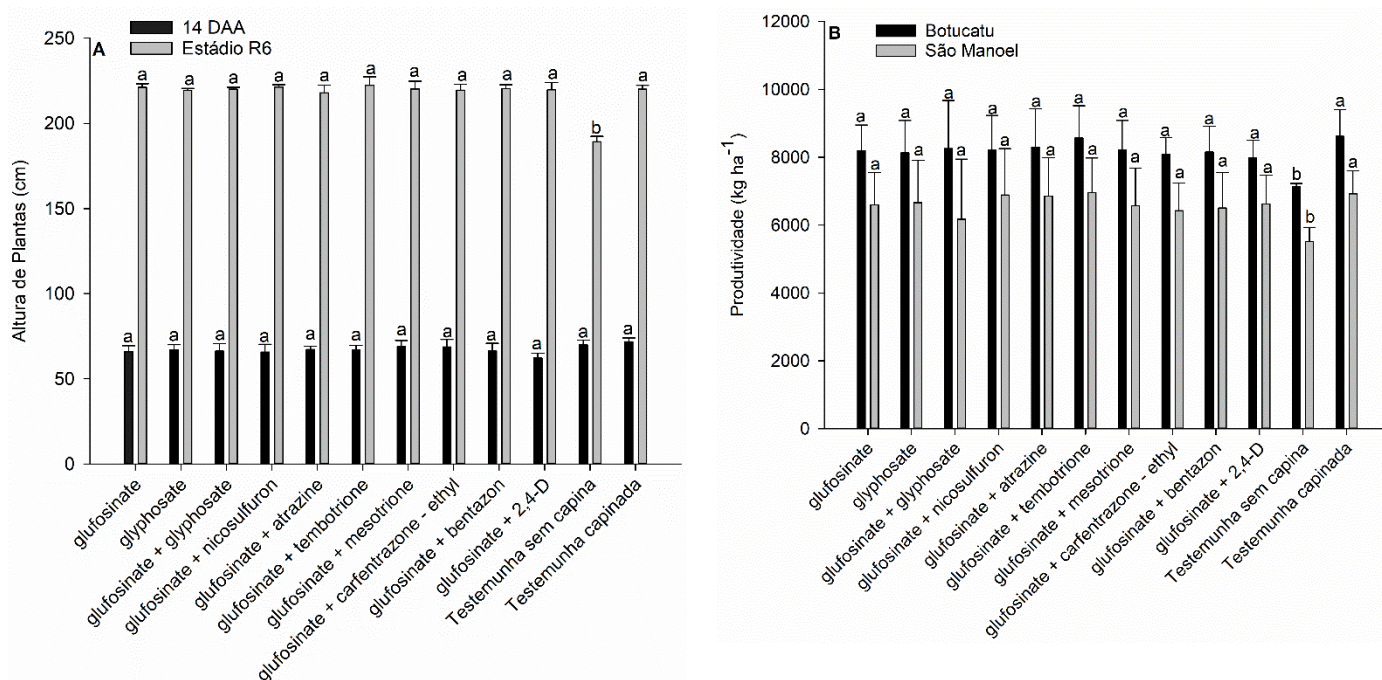


Figura 4 - Altura de plantas de milho aos 14 dias após a aplicação (CV %: 4,47) e no estágio R6 (A) (CV %: 9,81) e Produtividade de milho (B) (CV %: 7,83) após a aplicação de herbicidas em associação na pós-emergência, Botucatu e São Manoel – SP, na safra 2016/17. Médias $\pm$ Intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais entre as colunas de mesma cor não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), gráficos sem letras foram não significativos.

A adoção da aplicação de glufosinate e suas associações não promoveram redução de produtividade quando comparada a testemunha capinada (Figura 4). Resultados semelhantes a esses foram obtidos por Silva et al. (2017) que ao aplicar o glufosinate de forma isolada e em associação com glyphosate, atrazine e a associação dos três não reduziram a produtividade do milho com os genes *cp4-epsps* e *pat*. Armel et al. (2008), avaliando a associação de glufosinate com mesotrione em milho com o gene *pat* também não encontraram redução de produtividade com a interação dos dois produtos e aumentos de doses. Observou-se que alguns tratamentos apresentaram valores maiores de injúria visual e maior acúmulo de amônia (Figura 2), porém esses tratamentos não causaram redução de produtividade (Figura 4), o que demonstra que o milho tem capacidade de se recuperar e não apresentar redução na produtividade.

Os melhores herbicidas para o controle de *R. raphanistrum* (Figura 5) aos 28 DAA, foram glyphosate que proporcionou controle de 100 %, e as associações

de glufosinate + atrazine, glufosinate + mesotrione, glufosinate + bentazon e glufosinate + 2,4-D proporcionaram 100 % de controle. Os demais tratamentos apresentaram controle satisfatório, ou seja, acima de 80 %. A aplicação de glyphosate, 2,4-D e a associação de ambos, tem sido reportado com controle eficiente para *R. raphanistrum* (Vitorino et al., 2014). Para a espécie *C. rotundus* (Figura 5), a associação de glufosinate + bentazon proporcionou controle de 95 % não diferindo da testemunha capinada e diferindo dos demais herbicidas. Resultados semelhantes de controle de *Cyperus* spp. foram encontrados com o herbicida bentazon em milho (Rezende et al., 2014).

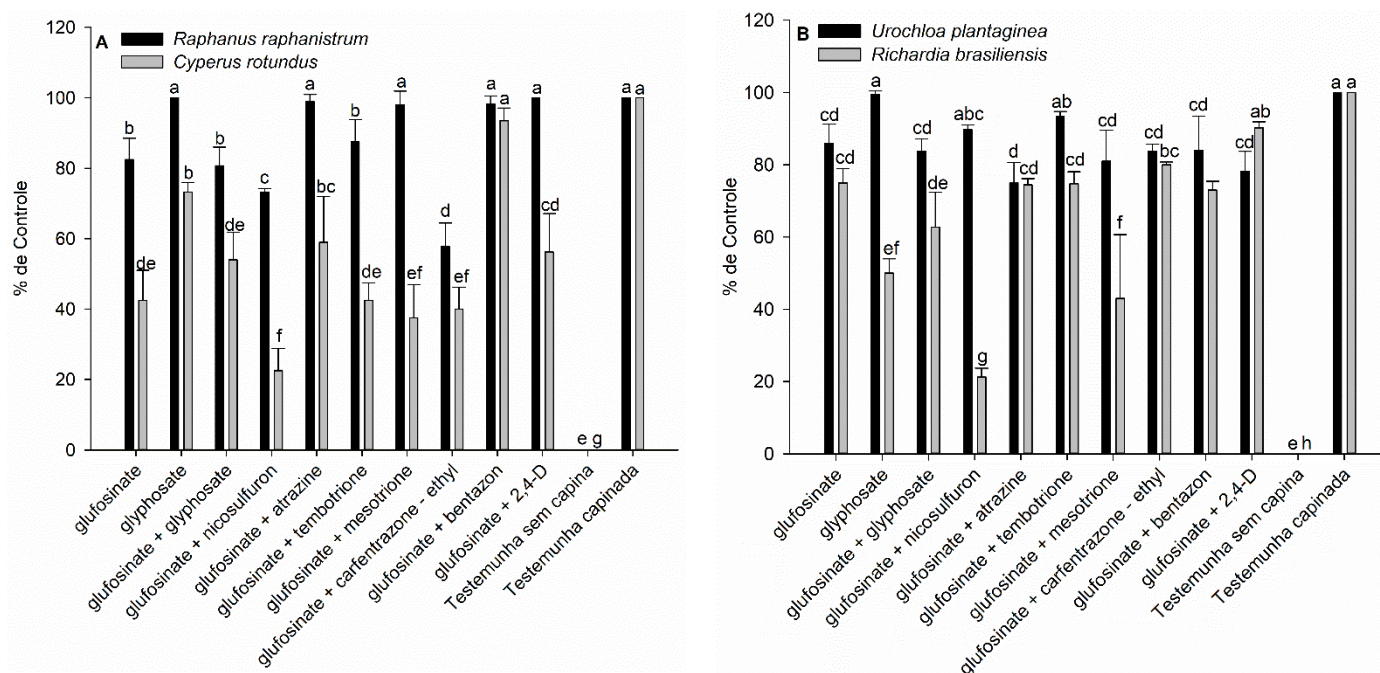


Figura 5 - Controle de plantas daninhas das espécies *Raphanus raphanistrum*, *Cyperus rotundus* (A) (CV %: 4,40 e 13,50); *Urochloa plantaginea*, *Richardia brasiliensis* (B) (CV %: 10,20 e 6,25) aos 28 DAA, na cultura do milho após a aplicação de herbicidas em pós-emergência, Botucatu e São Manuel – SP, na safra 2016/17. Médias $\pm$ Intervalo de confiança. Letras minúsculas iguais entre as colunas de mesma cor não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A aplicação de glyphosate e a associação de glufosinate + tembotrione promoveram excelentes níveis de controle (acima de 95 %), para a espécie *U. plantaginea* e foram significativamente iguais a testemunha capinada (Figura 5B), porém os demais tratamentos, com exceção de glufosinate + atrazine e glufosinate

+ 2,4-D, provocaram controle satisfatório (acima de 80 %). O controle de *U. plantaginea* é facilmente realizado com a aplicação de herbicidas inibidores a ACCase como o haloxyfop-methyl (Andrade Neto et al., 2016) e clethodim (Nonemacher et al., 2017), porém para o controle de plantas daninhas em pós-emergência do milho, uma das opções disponíveis são aplicações de atrazine e nicosulfuron (Marchesan et al., 2013; Galon et al., 2010). Também são alternativos os manejos com glyphosate e glufosinate + tembotrione em milho resistente a esses herbicidas, o que garante a rotação de ingredientes ativos na cultura do milho. Para o controle de *R. brasiliensis* (Figura 5) somente a associação de glufosinate + 2,4-D proporcionaram controle de 90 % e estatisticamente semelhante a testemunha capinada. A espécie *R. brasiliensis* é considerada planta de difícil controle (Takano et al., 2013), assim seu controle tem maior eficiência com a associação de herbicidas, como exemplo glyphosate + 2,4-D tem proporcionado controle de 100 % até plantas com mais de 10 folhas (Takano et al., 2013).

A associação de herbicidas com o amônio – glufosinate, pode ser uma alternativa para o controle de plantas daninhas, sem causar danos a cultura do milho que apresenta na sua constituição genética os genes *cp4-epsps* e *pat*.

2.4 Referências

Araldi R. et al. Chlorophyll fluorescence in guanandi tree (*Calophyllum brasiliense*) after herbicide application. **Planta Daninha**. 2015;33:77-82.

Armel G.R. et al. Mesotrione and glufosinate in glufosinate-resistant corn. **Weed Technology**. 2008;22:591–596

Barnett K.A. et al. Glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) control in WideStrike® flex cotton. **Weed Technology**. 2012;26:611–616.

Carbonari C.A. et al. Resistance to glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in LibertyLink® and WideStrike® cotton. **Planta**. 2016; 243:925-933.

Coetzer E., Al-Khatib K. Photosynthetic inhibition and ammonium accumulation in Palmer amaranth after glufosinate application. **Weed Science**. 2001;49:454–459.

Conab. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Sétimo levantamento safra 2017/2018**. 2018;4:1-160.

Dan H.A. et al. Controle de plantas daninhas na cultura do milho por meio de herbicidas aplicados em pré-emergência. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 2010;40:388–393.

Dayan F.E. et al. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2009;17:4022–4034.

Dayan F.E., Duke S.O. Natural compounds as next generation herbicides. **Plant Physiology**. 2014;166:1090–1105.

Dayan F.E. et al. Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. **Weed Science**. 2015;63:23–63.

Devine M.D. et al. Inhibition of amino acid biosynthesis. In Kleczkowski LA. Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 1993;45: 339- 367.

Andrade Neto E.F. et al. Eficiência do herbicida haloxyfop-methyl no controle de *Brachiaria* sp. em plantios de eucalipto. **Revista Espacios**. 2016;37: 20-25.

Galon L. et al. Avaliação do método químico de controle de papuã (*Brachiaria plantaginea*) sobre a produtividade do milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 2010;40:414-421.

Jakelaitis A. et al. Efeitos de herbicidas no controle de plantas daninhas, crescimento e produção de milho e *Brachiaria brizantha* em consórcio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 2007;36:53-60.

López-Ovejero R.F. et al. Alternativas de manejo químico da planta daninha *Digitaria insularis* resistente aos herbicidas inibidores da ACCase na cultura da soja. **Planta Daninha**. 2006;24:407-414.

Macedo R.S. et al. Effects of the herbicide bentazon on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Toxicology In Vitro**. 2008;22:716-722.

Manderscheid R. et al. Glufosinate treatment of weeds results in ammonia emission by plants. **Agriculture, ecosystems & environment**. 2005;109:129–140.

Marchesan E.D. et al. Controle de papuã (*Urochloa plantaginea*) e produtividade de milho em solo argiloso através de formulação e doses de atrazina com liberação controlada. **Ciência Rural**. 2013;43: 1974-1980.

Nimbal C.I. et al. Herbicidal Activity and Site of Action of the Natural Product Sorgoleone. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 1996;54:73-83.

Nonemacher F. et al. Associação de herbicidas aplicados para o controle de plantas daninhas em soja resistente ao glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**. 2017;16:142-151.

Osório C.W. et al. Milho RR submetido a diferentes manejos de herbicidas e adubação foliar. **Nativa**. 2015;3:78–82.

Owen M.D.K., Zelaya I.A. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. **Pesticide Management Science**. 2005;61:301–311.

Rezende P.N. et al. Eficiência de herbicidas aplicados em pós-emergência em milho consorciado com *Urochloa brizantha* cv. Marandu. **Revista Agroambiente Online**. 2014;8:345-351.

Rojano-Delgado A.M. et al. Liquid chromatography–diode array detection to study the metabolism of glufosinate in *Triticum aestivum* T-590 and influence of the genetic modification on its resistance. **Phytochemistry**. 2013;96:117-122.

Shin J.S. et al. Resistance levels and fitness of glufosinate-resistant transgenic sweet potato in field experiments. **Field Crops Research**. 2011;121: 324-332.

Silva A. et al. Seletividade de herbicidas isolados e em associações para milho RR2/LL®. **Revista Brasileira de Herbicidas**. 2017;16:60-66.

Vieira Júnior N.S. et al. Associação de herbicidas aplicados em pós-emergência na cultura do milho. **Global Science and Technology**. 2015;08:1–8.

Vitorino H.D.S. et al. Eficácia de herbicidas na dessecação de nabiça e sua ação na germinação de sementes. **Semina: Ciências Agrárias**. 2014;35:1119-1128.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nível de expressão do gene *pat* é proporcional a resistência ao glufosinate. A aplicação de glufosinate a campo não resultou em redução de produtividade nas diferentes tecnologias de milho. A associação de herbicidas resulta em injúrias visuais, incrementos nos teores de amônia e redução de ETR, porém não há redução de produtividade.

O glufosinate na dose 500 g i.a ha⁻¹ foi seletivo para as tecnologias de milho contendo o gene *pat* como marcador de seleção. A associação dos herbicidas glyphosate, nicosulfuron, atrazine, tembotrione, mesotrione, carfentrazone – ethyl, bentazon e 2,4-D, com o glufosinate pode ser utilizada sem riscos para a produtividade do milho com o gene *pat*.

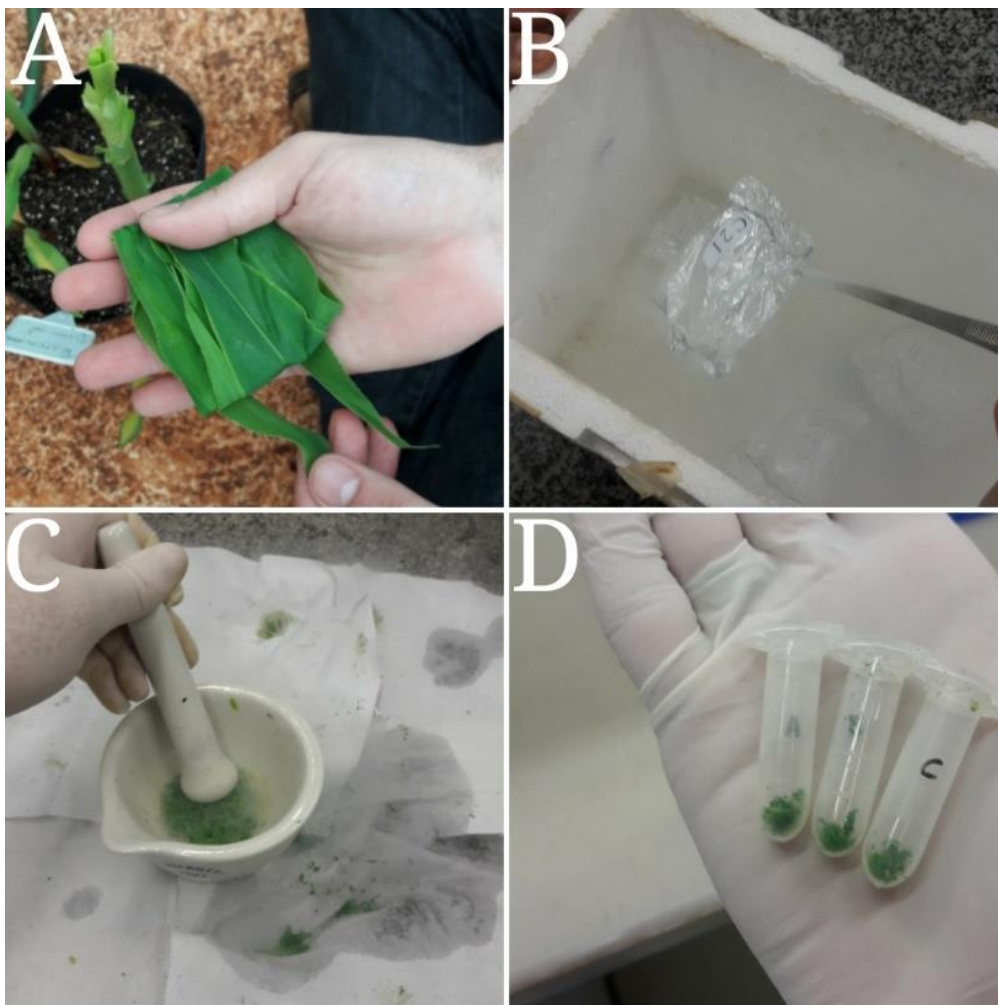
REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em 21 março de 2018.

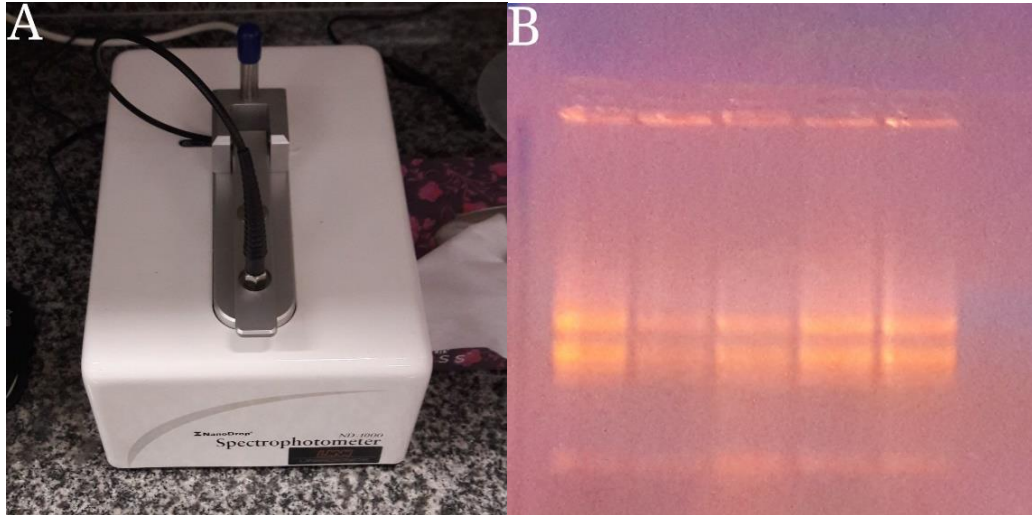
CTNBIO. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Liberação comercial de plantas de milho**. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>>. Acessado em 21 março de 2018.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 6 ed. Londrina: IAPAR, 2011. 697 p.

APÊNDICE A – Coleta das folhas de milho (A), armazenamento das amostras instantaneamente em nitrogênio líquido (B), maceração das amostras em almofariz (C) e armazenamento em tubos de 2 ml (D).



APÊNDICE B – Quantificação de RNA em Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer (A) verificação da qualidade do RNA em gel de agarose a 1 % (B) e PCR em tempo real da marca ABI PRISM 7000 Sequence Detector System.



APÊNDICE C – Pesagem das amostras (A), Sonicação das amostras em água com pH 3,5 (B), curva padrão de sulfato de amônia (C) e leitura das amostras em espectrofotômetro (D), para quantificação da amônia nas plantas.

