

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E
MUCURI – UFVJM

MÁRCIO MARQUES DA SILVA

**SENSIBILIDADE DE GENÓTIPOS DE MILHO GENETICAMENTE
MODIFICADOS A HERBICIDAS**

DIAMANTINA - MG
2019

MÁRCIO MARQUES DA SILVA

**SENSIBILIDADE DE GENÓTIPOS DE MILHO GENETICAMENTE
MODIFICADOS A HERBICIDAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador
Prof. Dr. José Barbosa dos Santos

DIAMANTINA - MG
2019

FICHA CATALOGRAFICA

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586s

Silva, Márcio Marques da
Sensibilidade de genótipos de milho geneticamente modificados a
herbicidas / Márcio Marques da Silva. 2019.
80 p. : il.

Orientador: José Barbosa dos Santos

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Produção
Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,
Diamantina, 2019.

1. Zea mays L. 2. Ascorbato peroxidase. 3. Atrazine. 4. Exresse
oxidativo. 5. Fibra em detergente neutro. I. Santos, José Barbosa dos.
II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri.

CDD 632.95

**SENSIBILIDADE DE GENÓTIPOS DE MILHO GENETICAMENTE
MODIFICADOS A HERBICIDAS**

Márcio Marques da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA EM 10 / 05 / 2019



Prof. Leonardo Barros Dobbss - UFVJM



Prof. Nisia Andrade Villela Dessimoni Pinto
- UFVJM



Prof. Edson Aparecido dos Santos - UFU



Prof. José Barbosa dos Santos - UFVJM
Presidente

DIAMANTINA
2019

OFEREÇO

*A Deus por estar sempre ao meu lado
me guiando e fortalecendo. Aos meus
pais e meus irmãos pelo amor e
compreensão, sempre me guiando pelo
caminho correto.*

DEDICO

A todos que acreditam em mim...

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a Deus por guiar-me e, sobretudo por seu amor que me fortaleceu e dotou-me de inteligência para chegar aonde cheguei.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) pela oportunidade de realização do curso e pela contribuição em minha formação acadêmica.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo e incentivo à pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal pelo incentivo e contribuição durante o curso de mestrado e doutorado.

Ao professor Dr. José Barbosa pelo apoio, dedicação, incentivo, amizade, exemplo e pela orientação desde o mestrado e também no doutorado.

Ao professor Dr. Edson Aparecido dos Santos pela amizade, profissionalismo e contribuição desde o início desta pesquisa.

Ao professor Dr. Evander Alves pela amizade, incentivo e pela orientação.

Aos professores Dr. Leonardo Dobbss; Dra. Nísia Andrade; Dr. Marcus Alvarenga; Dra Márcia Regina; Dra. Elizabethe Esteves pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos colegas do grupo de pesquisa INOVAHERB pela amizade, parceria e auxílio na execução desta pesquisa. Sem vocês não teria conseguido.

Agradeço também aos colegas de Unaí que contribuíram significativamente na execução desta pesquisa. Aos funcionários e técnicos de laboratório e do campo experimental em Couto de Magalhães, o apoio de vocês foi imprescindível para esta conquista.

A FAPEMIG, CNPq, Dow AgroSciences pela contribuição e incentivo a pesquisa.

Á todos os meus familiares, principalmente os meus irmãos pelo incentivo, apoio e suporte, vocês são minha base.

A todos os meus amigos da cidade de Janaúba e outros. Aos antigos colegas de graduação. Aos que por graça de Deus conheci aqui em Diamantina, os irmão do GOU, RCC, do GPP. Aos amigos seminaristas e da diocese de Janaúba e também Diamantina e ao reitor Padre Charles.

A todos que estiveram comigo durante esse período e, que de alguma forma contribuíram para o bom êxito desta pesquisa, o meu muito obrigado, que Deus possa retribuir em dobro todo esforço e dedicação.

Agradeço pela confiança em mim depositada! Que Deus os abençoe!

RESUMO

MÁRCIO MARQUES DA SILVA. **SENSIBILIDADE DE GENÓTIPOS DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADOS A HERBICIDAS**. 2019. 80p. (Tese - Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

As culturas geneticamente modificadas (GM) têm impulsionado o crescimento da agricultura nos últimos anos. Porém, o uso insustentável da tecnologia pode comprometer seu avanço. O uso indiscriminado de herbicidas em culturas GM contribuiu para a seleção de plantas daninhas resistentes. Herbicidas como glyphosate têm despontado como o principal responsável pela seleção dessas espécies. Para tanto, opções de manejo de plantas daninhas em culturas GM estão em estudos, com a finalidade de reduzir a pressão dessas moléculas sobre as plantas daninhas. A mesma situação também começa a ser descrita para o ammonium glufosinate que é uma alternativa ao glyphosate. Atentos às projeções, estudos envolvendo alternativas de manejo nessas culturas devem ser realizados. Com isso, objetivou-se nesse estudo, avaliar a segurança da aplicação dos herbicidas atrazine e nicosulfuron, sobre os genótipos de milho GM, Herculex[®] e PowerCore[®]. Estudos a campo foram realizados envolvendo três genótipos de milho, dois genótipos GM Herculex[®] e PowerCore[®], e um isohíbrido, isento dos transgenes (controle). Os genótipos foram submetidos aos herbicidas atrazine, nicosulfuron e ammonium glufosinate nas safras de 2016 e 2017. Após a aplicação, foram avaliadas a atividade fisiológicas das plantas por meio da análise de fluorescência da *clorofila a*. Também avaliadas a atividade oxidativa das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase do ascorbato (APX). Aos 100 dias após a semeadura, plantas foram coletadas para avaliação da composição químico-bromatológicas, e no estágio R6 foram coletados os grãos para avaliação da produção e composição química. Os herbicidas promoveram estresse vegetal no sétimo dia após a aplicação no genótipo Herculex. Ammonium glufosinate, nicosulfuron e atrazine + nicosulfuron reduziram a atividade da CAT, SOD, e o atrazine aumentou a atividade das enzimas. Não foi observado efeito dos herbicidas sobre a produção dos grãos. A aplicação de atrazine, nicosulfuron e ammonium glufosinate não afetaram a composição químico bromatológica das plantas, qualidade química e rendimentos de grãos de milho GM.

Palavras-chave: *Zea mays L.*, Ascorbato peroxidase, atrazine, estresse oxidativo, fibra em detergente neutro, ammonium glufosinate, nicosulfuron, superóxido dismutase.

ABSTRACT

MÁRCIO MARQUES DA SILVA. **SENSITIVITY OF GENOTYPES OF CORN GENETICALLY MODIFIED TO HERBICIDES.** 2019. 80p. Tese (Doctor in Vegetable Production) – Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valley, Diamantina, 2019.

Genetically modified (GM) crops have boosted agricultural growth in recent years. However, the unsustainable use of technology can threaten its advancement. The indiscriminate use of herbicides in GM crops contributed to the selection of resistant weeds. Herbicides like glyphosate have emerged as the main responsible for the selection of these species. Therefore, weed management options in GM crops are under study, in order to reduce the pressure of these molecules on weeds. The same situation also begins to be described for ammonium glufosinate which is an alternative to glyphosate. Attentive to the projections, studies involving management alternatives in these crops should be carried out. The objective of this study was to evaluate the safety of herbicides atrazine and nicosulfuron on GM, Herculex® and PowerCore® maize genotypes. Field studies were carried out involving three maize genotypes, two GM Herculex® and PowerCore® genotypes, and one isogenic, free of transgenes (control). The genotypes were submitted to the herbicides atrazine, nicosulfuron and ammonium glufosinate in the harvests of 2016 and 2017. After application, the physiological activity of the plants was evaluated by fluorescence analysis of chlorophyll a. The oxidative activity of the catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) enzymes were also evaluated. At 100 days after sowing, plants were collected to evaluate the chemical-bromatological composition, and in the R6 stage the grains were collected for evaluation of the chemical composition and composition. The herbicides promoted plant stress on the seventh day after application in the Herculex genotype. Ammonium glufosinate, nicosulfuron and atrazine + nicosulfuron reduced CAT, SOD activity, and atrazine increased enzyme activity. No effect of herbicides on grain yield was observed. The application of atrazine, nicosulfuron and ammonium glufosinate did not affect the chemical composition of plants, chemical quality and grain yield of GM maize.

Keywords: *Zea mays* L., Ascorbate peroxidase, atrazine, oxidative stress, neutral detergent fiber, glufosinate-ammonium, nicosulfuron, superoxide dismutase.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO CIENTÍFICO I. ATRAZINE, NICOSULFURON E AMMONIUM GLUFOSINATE NÃO AFETAM O DESEMPENHO DE GENÓTIPOS DE MILHO TRANSGÊNICO.	Pág.
Figura 01 Precipitação e temperatura entre os meses de março a setembro de 2016, município de Couto de Magalhães-MG.	22
Figura 02 Precipitação e temperatura entre os meses de novembro de 2016 a abril de 2017, município de Unaí-MG.	23
Figura 03 Fluorescência inicial da clorofila a (Fo); Relação fluorescência variável/fluorescência máxima (Fv/Fm) e taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas de milho transgênico submetidos à aplicação de herbicidas atrazine (Atra), ammonium glufosinate (Glufu) nicosulfuron (Nicos) e na ausência de herbicidas (Test).	27
Figura 04 Número de plantas ha ⁻¹ e de espigas ha ⁻¹ , peso fresco e seco ha ⁻¹ , produtividade (t ha ⁻¹) e número de grãos por espiga de plantas de milho GM sob efeito de herbicidas. PT: Power Core + testemunha; PN: Power Core + nicosulfuron; PA: Power Core + atrazine; PG: Power Core + ammonium glufosinate; IT: isolinha + testemunha; IN: isolinha + nicosulfuron; IA: isolinha + atrazine; IG: isolinha + ammonium glufosinate; HT: Herculex + testemunha; HN: Herculex + nicosulfuron; HA: Herculex + atrazine; HG: Herculex + ammonium glufosinate. Cada barra representa um tratamento, sendo que no interior de cada barra a linha contínua representa a média global para cada tratamento e a linha pontilhada representa a mediana entre os valores máximo e mínimo de cada parcela.	30
ARTIGO CIENTÍFICO II. HERBICIDAS AFETAM A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE PLANTAS DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADAS?	
Figura 01 Precipitação e temperatura entre os meses de novembro de 2016 a abril de 2017, município de Unaí-MG.	46
Figura 02 Atividade das enzimas catalase (CAT) (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹) e superóxido dismutase (SOD) (unidades mg ⁻¹) em plantas de milho GM após sete e quatorze dias da aplicação dos herbicidas atrazine (At), nicosulfuron (Ni) e ammonium glufosinate (Gl).	48
Figura 03 Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹) nos genótipos de milho Herculex (Her.), isohíbrido (Iso.) e PowerCore (Power) após sete e quatorze dias da aplicação dos herbicidas atrazine (At), nicosulfuron (Ni) e ammonium glufosinate (Gl). *Colunas seguidas por letras diferentes, minúsculas por genótipo e maiúscula por herbicida, diferem entre si pelo teste F e	49

Figura 04 Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade de erro. Número de plantas ha^{-1} , de espigas ha^{-1} e produtividade (t ha^{-1}) dos genótipos de milho Power Core, sob efeito do atrazine (PA), ammonium glufosinate (PG), nicosulfuron isolado (PN), ou em mistura ao atrazine (PAN) e testemunha (PT); isolinha, sob efeito do atrazine (IA), ammonium glufosinate (IG), nicosulfuron isolado (IN), ou em mistura ao atrazine (IAN) e testemunha (IT) e; Herculex sob efeito do atrazine (HA), ammonium glufosinate (HG), nicosulfuron isolado (HN), ou em mistura ao atrazine (HAN) e testemunha (HT).

51

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO I. ATRAZINE, NICOSULFURON E AMMONIUM GLUFOSINATE NÃO AFETAM O DESEMPENHO DE GENÓTIPOS DE MILHO TRANSGÊNICO.

Pág.

Tabela 01 Matéria seca da massa seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), digestibilidade da matéria seca (DMS), nutrientes disponíveis totais (NDT) e proteína bruta de plantas de milho GM sob efeito de herbicidas.

29

ARTIGO CIENTÍFICO II. HERBICIDAS AFETAM A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE PLANTAS DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADAS?

Tabela 01 Análise de variância da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em plantas de milho GM após sete (7) e quatorze (14) dias da aplicação de herbicidas

47

ARTIGO CIENTÍFICO III. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE GRÃOS DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO SOB EFEITO DA APLICAÇÃO DE HERBICIDAS

Tabela 01 Produção e peso de mil grãos de milho GM sob efeito da aplicação dos herbicidas atrazine (atr), ammonium glufosinate (glu), nicosulfuron (nic) e Testemunha (Test).

69

Tabela 02 Umidade, lipídeos e proteína de grãos de milho GM sob efeito da aplicação de herbicidas atrazine (atr), ammonium glufosinate (glu), nicosulfuron (nic) e Testemunha (Test).

70

Tabela 03 Teor de fibra bruta, cinzas e carboidratos de grãos de milho GM sob efeito da aplicação de herbicidas atrazine (atr), ammonium glufosinate (glu), nicosulfuron (nic) e Testemunha (Test).

70

Tabela 04	Acidez total titulável e teor de sólidos solúveis de grãos de milho GM sob efeito da aplicação de herbicidas atrazine (atr), ammonium glufosinate (glu), nicosulfuron (nic) e Testemunha (Test).	71
Tabela 05	Teor de fenóis totais e teor de açúcares redutores Acidez de grãos de milho GM sob efeito da aplicação de herbicidas atrazine (atr), ammonium glufosinate (glu), nicosulfuron (nic) e Testemunha (Test).	72

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
ARTIGO CIENTÍFICO I.....	18
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	21
Resultados.....	25
Discussão	31
Referências	36
ARTIGO CIENTÍFICO II	41
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	44
Resultados.....	47
Discussão	51
Referências	55
ARTIGO CIENTÍFICO III.....	62
Introdução.....	64
Material e Métodos.....	66
Resultados.....	68
Discussão	73
Referências	75
CONCLUSÃO GERAL	80

INTRODUÇÃO GERAL

Um dos desenvolvimentos mais notáveis na agricultura nos últimos anos foi a introdução das variedades de culturas geneticamente modificadas (GM) (Perry et al., 2016). Desde então, tal tecnologia tem atingido patamares altíssimos de aceitação, chegando a 180 milhões de hectares cultivados em todo mundo (Brookes e Barfoot, 2018). O principal impacto da tecnologia GM sobre a agricultura de modo geral tem sido o manejo fitossanitário mais econômico, menos dispendioso e mais fácil para os agricultores. Bom exemplo são os rendimentos maiores a partir de um melhor controle de plantas daninhas (Brookes e Barfoot, 2017).

No entanto, o cultivo contínuo de plantas tolerantes a herbicidas e o uso intensivo de glyphosate nos últimos 20 anos levaram à seleção de pelo menos 43 espécies de plantas daninhas resistentes em todo o mundo (Heap, 2019; Comont et al., 2019). O uso de glyphosate no setor agrícola aumentou significativamente após a introdução das culturas GM, saindo de 16 mil toneladas em 1995 para 79 mil toneladas em 2014 (Benbrook, 2016). Em regiões em que as culturas geneticamente modificadas, com tolerância ao herbicida glyphosate, têm sido amplamente cultivadas, a ocorrência de resistência de plantas daninhas a esse herbicida pode afetar a eficiência da tecnologia (Brookes e Barfoot, 2017; Perry et al., 2016). Isso porque uma variedade bastante ampla de herbicidas seletivos foi substituída por uma ou duas moléculas de amplo espectro, principalmente o glyphosate, resultando na seleção de plantas daninhas resistentes (Brookes e Barfoot, 2017).

Diante disso, os produtores estão sendo cada vez mais aconselhados a serem proativos e incluírem outros herbicidas com modos de ação diferentes e complementares ao glyphosate (Brookes e Barfoot, 2017). Além disso, culturas GM com resistência a outros herbicidas são desenvolvidas, ou já estão no mercado com várias características de resistências (Schütte et al., 2017). Embora o glyphosate e o ammonium glufosinate sejam herbicidas de baixo risco em relação à evolução de resistência (Schütte et al., 2017), o modo como têm sido utilizados podem induzir a seleção de plantas daninhas resistentes.

Moléculas como ammonium glufosinate estão ganhando novos mercados, como alternativa ao uso do glyphosate (Barnes et al., 2017). No Brasil, a prática é incentivada com os novos GMs de milho e algodão que apresentam resistência ao glufosinato. LibertLink[®] e PowerCore[®] são genótipos de milho com as proteínas PAT e CP4 EPSPS expressadas pelos genes *pat* e *cp4 epsps* introduzidos para tolerância ao

ammonium glufosinate e ao glyphosate (Cerqueira et al., 2017; Carbonari et al., 2016; Krenchinski et al., 2018). O ammonium glufosinate é um herbicida não seletivo, de contato e de amplo espectro. Esse herbicida inibe a enzima glutamina sintetase, causando rápida acumulação de amônia e eventualmente ruptura da membrana celular e necrose (Aulakh e Jhala, 2015). Com a introdução desses novos genótipos é esperada a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes em função do aumento das áreas de plantio (Fernández et al., 2016; Jalaludin et al., 2017).

A rotação com herbicidas alternativos em cultivos GM tem sido recomendada para minimizar o problema (Owen, 2016; Davis e Frisvold, 2017; Schutte et al., 2017). Herbicidas que foram usados anteriormente à introdução das culturas GM são alternativas viáveis ao combate à seleção de biótipos resistentes. Moléculas como atrazine e nicosulfuron, tradicionalmente utilizados na cultura do milho desde a década de 50 (Dong et al., 2017), são grandes aliados na redução da seleção de resistência aos herbicidas das plantas GMs. As combinações de herbicidas alternativos com diferentes modos de ação, seja em aplicação sequencial ou mistura de tanque, podem contribuir para melhorar o controle de plantas daninhas resistentes além de retardar a evolução de resistência (Tahmasebi et al., 2018).

O atrazine é aplicado para o controle de plantas daninhas de folhas largas em pré e pós emergência na cultura do milho. É bastante eficaz, relativamente barato, flexível, compatível com outros herbicidas e relativamente insensível ao clima (Benito et al., 2019; Dong et al., 2017). Essas características colocam o herbicida na frente aos demais, apesar dos problemas envolvidos com a contaminação de águas subterrâneas. Além disso, a proibição no uso do atrazine em alguns estados americanos contribuiu para o aumento das áreas de cultivo das culturas GM com resistência a herbicidas e, conseqüentemente, para os problemas envolvendo a seleção da resistência (Dong et al., 2017).

Da mesma forma, o nicosulfuron é pertencente ao grupo das sulfonilureias e inibe a acetolactato sintase, primeira enzima na via na biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada: valina, leucina e isoleucina, em cloroplastos. O herbicida controla muitas gramíneas e algumas folhas largas no milho (Sarabi et al., 2018).

Apesar da frequência de aplicação e eficiência dos herbicidas atrazine e nicosulfuron sobre a cultura do milho, poucos são os estudos envolvendo a segurança dos mesmos sobre os novos genótipos GM listados anteriormente. Até o momento, o que se sabe é que os herbicidas podem interagir antes ou depois de serem absorvidos pelas

plantas, apresentando resultados de interação sinérgica, aditiva ou antagônica (Sarabi et al., 2018). No entanto, alterações durante o desenvolvimento dos GM podem afetar a tolerância aos herbicidas, tornando-se necessários estudos de equivalência e segurança para uso dessas moléculas sobre os novos eventos disponíveis para comercialização. Portanto, o objetivou-se com esse trabalho, avaliar a segurança da aplicação dos herbicidas atrazine e nicosulfuron sobre os genótipos de milho GM, Herculex[®] e PowerCore[®].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aulakh, J.S., Jhala, A.J., 2015. Comparison of Glufosinate-Based Herbicide Programs for Broad-Spectrum Weed Control in Glufosinate-Resistant Soybean. *Weed Technology* 29: 419–430.

Barnes, E.R., Knezevic, S.Z., Sikkema, P.H., Linquist, J.L., Jhala, A.J. 2017. Control of glyphosate-resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in glufosinate-resistant soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-10.

Benbrook, C.M. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe* 28:3.

Benito, N., Carranza, C.S., Magnolo, C.E., Barberis, C.L. 2019. Effect of atrazine on growth and production of AFB₁ in *Aspergillus* section Flavi strains isolated from maize soils. *Mycotoxin Research* 35: 55-64

Brookes, G., Barfoot, P. 2017. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996–2015: Impacts on pesticide use and carbon emissions. *GM Crops & Food* 8: 117-47.

Brookes, G., Barfoot, P. 2018. Farm income and production impacts of using GM crop technology 1996–2016. *GM Crops & Food* 9: 59-89.

Carbonari, C.A., Latorre, D.O., Gomes, G.L.G.C., Velini, E.D., Owens, D.K., Pan, Z., Dayan, F.E. 2016. Resistance to glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in LibertyLink[®] and WideStrike[®] cotton. *Planta* 243: 925-33.

Cerqueira, D.T.R. De, Schafer, A.C., Rápido, B.J., Herman, R.A. 2017. Agronomic Performance of Insect-Protected and Herbicide-Tolerant MON 89034 × TC1507 × NK603

× DAS-40278–9 Corn Is Equivalent to That of Conventional Corn. *GM Crops&Food* 8: 149-55.

Comont, D., Hicks, H., Crook, L., Hull, R., Cocciantelli, E., Hadfield, J., Childs, D., Freckleton, R., Neve, P., 2019. Evolutionary epidemiology predicts the emergence of glyphosate resistance in a major agricultural weed. *New Phytologist* 223(3): 1584-1594.

Davis, A.S., Frisvold, G.B. 2017. Are herbicides a once in a century method of weed control? *73(11)*: 2209-2220.

Dong, F., Mitchell, P.D., Davis, V.M., Recker, R., 2017a. Impact of atrazine prohibition on the sustainability of weed management in Wisconsin maize production. *Pest Management Science* 73: 425–434.

Fernández, P., Alcántara, R., Osuna, M.D., Vila-Aiub, M.M., Padro, R. 2016. Forward selection for multiple resistance across the non-selective glyphosate, glufosinate and oxyfluorfen herbicides in *Lolium* weed species. *Pest Management Science* 73(5): 936-944.

Heap, I. 2019. The international survey of herbicide resistant weeds, Online. Disponível em: <http://www.weedscience.com/Summary/MOA.aspx>. Acesso em: 10 janeiro de 2019.

Jalaludin, A., Yu, Q., Zoellner, P., Beffa, R., Powles, S.B. 2017. Characterisation of glufosinate resistance mechanisms in *Eleusine indica*. *Pest Management Science* 73(6): 1091-100.

Krenchinski, F.H., Albrecht, A.J.P., Cesco, V.J.S., Rodrigues, D.M., Pereira, V.G.C., Albrecht, L.P., Carbonari, C.A.; Filho, R.V. 2018. Post-emergent applications of isolated and combined herbicides on corn culture with cp4-epsps and pat genes. *Crop Protection* 106: 156-62.

Owen, M.D.K. 2016. Diverse approaches to herbicide-resistant weed management. *Weed Science* 64(1): 570-84.

Perry, E.D., Ciliberto, F., Hennessy, D.A., Moschini, G., 2016. Genetically engineered crops and pesticide use in U.S. maize and soybeans. *Science Advances* 2: e1600850.

Sarabi, V., Ghanbari, A., Mohassel, M.H.R., Mahallati, M.N., Rastgoo, M., 2018. Interaction of foramsulfuron or nicosulfuron with 2,4-D + MCPA on important broadleaf weeds in corn (*Zea mays* L.). *Plant Production Science* 21: 203–214.

Schutte, G., Eckerstorfer, M., Rastelli, V., Reichenbecher, W., Restrepo-Vassalli, S., Ruonhonen-Lehto, M., Saucy, A.G.W., Mertens, M. 2017. Herbicide resistance and biodiversity: ahronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environmental Sciences Europe* 29(5): 1-12.

Tahmasebi, B.K., Alebrahim, M.T., Roldán-Gómez, R.A., Silveira, M.S., Carvalho, L.B., Cruz, R.A., Prado, R. 2018. Effectiveness of alternative herbicides on three *Conyza* species from Europe with and without glyphosate resistance. *Crop Protection* 112: 350-355.

ARTIGO CIENTÍFICO I

ATRAZINE, NICOSULFURON E AMMONIUM GLUFOSINATE NÃO AFETAM O DESEMPENHO DE GENÓTIPOS DE MILHO TRANSGÊNICO

Resumo: O aumento de áreas com cultivos geneticamente modificados e uso incorreto de herbicidas contribuíram para a seleção de plantas daninhas resistentes a herbicidas. A rotação de ingredientes ativos é uma recomendação para manejo da resistência dessas espécies, porém, pouco se sabe a respeito dos efeitos de herbicidas sobre as novas cultivares de milho GM disponível no mercado. Diante disso, o objetivo foi estudar o efeito de atrazine, nicosulfuron e ammonium glufosinate sobre a atividade fotossintética, composição químico-bromatológica e rendimento dos genótipos de milho Herculex[®] (Cry1F, PAT) e PowerCore[®] (Cry1F, Cry1Ac, CP4.EPSPS, PAT, Cry2Ab2) e um isohíbrido convencional como controle. Em duas épocas do ciclo, após aplicação dos herbicidas, foram avaliadas a fluorescência da *clorofila a*, além da composição químico-bromatológica e produtividade de grãos na colheita. Atrazine e nicosulfuron promoveram estresse vegetal no sétimo dia após a aplicação no genótipo Herculex, sem efeito nas demais variáveis. A aplicação dos herbicidas atrazine, nicosulfuron e ammonium glufosinate não afetaram a composição das plantas e também a qualidade e rendimento dos grãos de milho. Estes herbicidas podem ser utilizados em programas de manejo de plantas daninhas em milho resistente ao ammonium glufosinate.

Palavra Chave: Herculex, Power Core, GM, grãos, químico-bromatológica

Abstract: The increase of areas with genetically modified crops and incorrect use of herbicides contributed to the selection of herbicide resistant weeds. Rotation of active ingredients is a recommendation for resistance management of these species, but little is known about the effects of herbicides on the new GM maize cultivars available. Therefore, the objective was to study the effect of atrazine, nicosulfuron and ammonium glufosinate on the photosynthetic activity, chemical-bromatological composition and yield of maize genotypes Herculex[®] (Cry1F, PAT) and PowerCore[®] (Cry1F, Cry1Ac, CP4.EPSPS, PAT, Cry2Ab2) and conventional isogenic as a control. In two seasons of the cycle, after application of the herbicides, the chlorophyll a fluorescence, chemical-bromatological composition and grain yield at harvest were evaluated. Atrazine and nicosulfuron promoted plant stress on the seventh day after application in the Herculex

genotype, with no effect on the other variables. The application of the herbicides atrazine, nicosulfuron and ammonium glufosinate did not affect the composition of the plants and also the quality and yield of the maize kernels. These herbicides can be used in weed management programs in maize resistant to ammonium glufosinate.

Keywords: Herculex, Power Core, GM, grains, chemical-bromatological

Introdução

O plantio sistemático de culturas geneticamente modificadas (GM) tolerantes a herbicidas, como glyphosate e recentemente, ammonium glufosinate, favoreceu a seleção de populações de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. Fenômeno relatado para soja (Benbrook, 2016; Owen et al., 2014; Owen, 2016), algodão (Manalil et al., 2017) e milho (Nicolia et al., 2013; Shaner et al., 2012; Coupe e Capel, 2016). Biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas ao final de 2018 somam 43 para o glyphosate, 39 para os herbicidas auxínicos e quatro para o ammonium glufosinate (Heap, 2017). A inclusão de outros herbicidas com mecanismos de ação diferentes para o controle de plantas daninhas em culturas GM tem sido recomendada com intuito de evitar a pressão de seleção (Brookes e Barfoot, 2017). Com isso, verifica-se redução de 15% no uso do glyphosate entre 1998 a 2015 (Brookes e Barfoot, 2017).

Moléculas como o ammonium glufosinate estão ganhando novos mercados, como alternativa ao uso do glyphosate. No Brasil, a prática é incentivada com as cultivares GMs de milho e algodão que apresentam resistência ao ammonium glufosinate. LibertLink[®] e Power Core são novos genótipos de milho com as proteínas PAT e CP4 EPSPS expressadas pelos genes *pat* e *cp4 epsps* introduzidos para tolerância ao ammonium glufosinate e ao glyphosate (Cerqueira et al., 2017; Carbonari et al., 2016; Krenchinski et al., 2018).

A seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes ao ammonium glufosinate é esperado em função do aumento das áreas de plantio dessas novas variedades (Jalaludin et al., 2017). Herbicidas alternativos ao ammonium glufosinate devem ser indicados para as áreas cultivadas com cultivo das variedades LibertLink[®] e Power Core. Esses herbicidas devem ser testados sobre essas variedades para garantir que não alterem o desempenho das plantas destinadas para silagem ou para grãos.

Atrazine e nicosulfuron são herbicidas registrados para o controle de plantas daninhas nas variedades não transgênicas de milho (MAPA, 2018). O atrazine é uma alternativa para o controle de plantas daninhas resistentes em culturas GM, como o milho, apresenta excelente controle das plantas daninhas, sendo eficaz, barato com efeito residual no solo, que previne a emergência de ervas daninhas por um longo período após a aplicação (Beckie e Hall, 2014; Dong et al., 2017; Hou et al., 2017). Enquanto o nicosulfuron fornece controle pós-emergência de plantas daninhas de folhas largas em milho. É bastante utilizado devido sua alta atividade herbicida a baixas taxas de aplicação (Sun et al., 2017). A eficácia do nicosulfuron compensa devido à escassez de herbicidas pós-emergentes no milho (Wang et al., 2018).

Alguns cultivares de milho podem apresentar diferentes níveis de tolerância ao nicosulfuron (Sun et al., 2017). Estudos sobre a seletividade destacam a necessidade de observar alguns fatores, como o híbrido utilizado, o período sazonal de aplicação do fertilizante nitrogenado, o estágio fenológico da cultura no momento da aplicação, condições meteorológicas, uso e dosagem inadequados (Sun et al., 2017). Esses estudos também são necessários nos genótipos GM. A Seletividade do nicosulfuron está associada ao metabolismo do citocromo P450 (Liu et al., 2018). E alterações genéticas durante o processo de obtenção dos genótipos GM podem afetar a tolerância através de efeitos indiretos sobre genes que codificam proteínas responsáveis pela degradação dessas moléculas no interior da planta. Com redução no rendimento e estresse fisiológico das plantas em contato com o herbicida. Já para o atrazine, o acúmulo do herbicida tem demonstrado causar respostas tóxicas em plantas não alvo, induzindo estresse oxidativo com efeito negativo para o crescimento e produtividade das culturas (Oliveira et al., 2015). Apesar da tolerância do milho ao atrazine (Oliveira et al., 2015), a aplicação do herbicida pode causar efeito negativo sobre as plantas de milho GM. Diante do cenário para os próximos anos com os cultivos GM tolerante a herbicidas, e necessidade de comprovar a viabilidade dos herbicidas atrazine e nicosulfuron sobre as variedades Herculex[®] e Power Core. Objetivou-se com esse trabalho, avaliar a segurança da aplicação dos herbicidas atrazine e nicosulfuron sobre os genótipos de milho GM.

Material e Métodos

Dois experimentos de campo foram montados nas safras agrícolas 2016/17 e 2017/18 no estado de Minas Gerais, Brasil. No primeiro ano o experimento foi na

Estação Experimental de Rio Manso, pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da UFVJM, com coordenadas geográficas 18° 4' de latitude sul, 43° 28' de longitude oeste e 733 m de altitude. A temperatura e a precipitação foram monitoradas durante a execução do experimento (Figura 01).

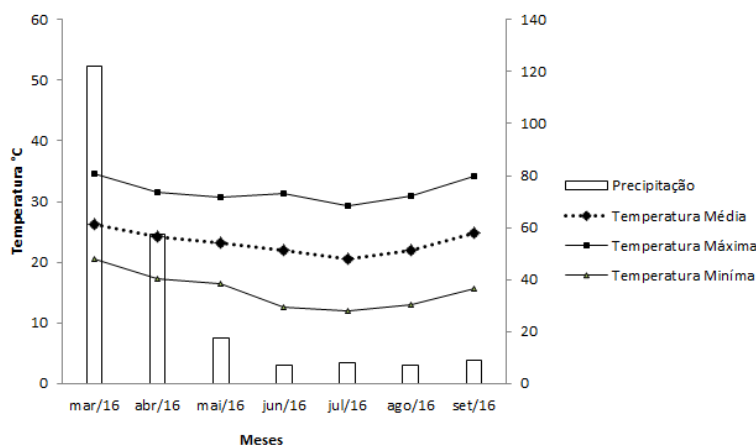
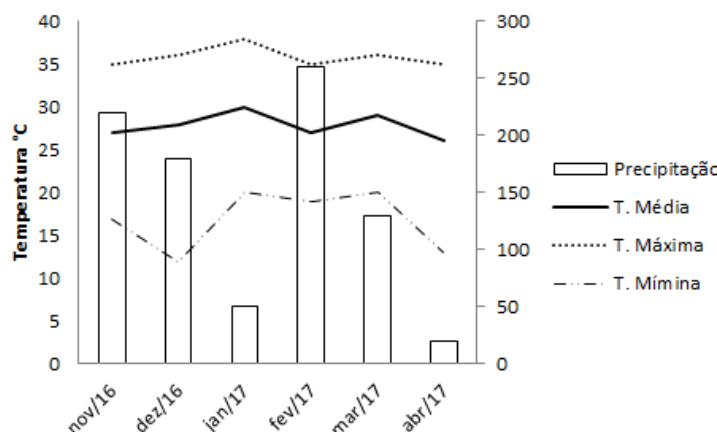


Figura 01. Precipitação e temperatura entre os meses de março a setembro de 2016, município de Couto de Magalhães-MG.

A semeadura do milho foi em um solo Latossolo Vermelho, com as seguintes características químicas; pH_{água} (1:2,5) = 5,4; CTC pH7 = 1,78 cmolc dm⁻³; M.O.= 1,78 dag dm⁻³ Ca = 1,0 cmolc dm⁻³; Mg = 0,4 cmolc dm⁻³; Al trocável = 0,1 cmolc dm⁻³; P disponível = 2,1 mg dm⁻³; K trocável = 110 mg dm⁻³; V = 42%; textura fraco arenoso, com 15% de argila, 23% de silte e 62% de areia.

No segundo ano, o experimento foi na Estação Experimental de Unaí, pertencente à FCA/UFVJM, no município de Unaí/MG nas coordenadas 16° 21' 27" S de latitude e longitude 46° 54' 22" W, e 575 m de altitude. O solo da região é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, pH_{água} (1:2,5) = 5,8; CTC pH7 = 4,2 cmolc dm⁻³; M.O.= 3,1 dag dm⁻³ Ca = 2,1 cmolc dm⁻³; Mg = 1,4 cmolc dm⁻³; Al trocável = 0,0 cmolc dm⁻³; P disponível = 2,1 mg dm⁻³; K trocável = 270 mg dm⁻³; V = 54%. A temperatura e a precipitação foram monitoradas durante a execução do experimento (Figura 02).



Fonte: INMET

Figura 02. Precipitação e temperatura entre os meses de novembro de 2016 a abril de 2017, município de Unaí-MG.

Delineamento experimental

O ensaio foi desenvolvido em delineamento com blocos casualizados com três repetições, em esquema fatorial 4x3. O fator um foi composto pelos herbicidas ammonium glufosinate; atrazine e nicosulfuron e tratamento controle sem aplicação de herbicidas e sem capina. O segundo fator foi composto pelos genótipos de milho geneticamente modificados Herculex® e PowerCore® e um isohíbrido com ausência dos transgenes.

Material Genético e Herbicidas

O genótipo de milho Herculex, evento TC1507, apresenta os genes *cry1F* que, confere resistência ao ataque de insetos lepidópteros, e o gene PAT, originado de *Streptomyces viridochromogenes*, que inibe a atividade do herbicida ammonium glufosinate. Já o genótipo PowerCore, registrado pelo evento MON89034 x TC1507 x NK603, apresenta os genes *cry1F*, *cry2Ab2* e o gene *cry1A.105* que conferem resistência ao ataque de lepidópteros. Esse genótipo também apresenta os genes PAT e *cp4epsps* (aroA:CP4) que conferem resistência aos herbicidas ammonium glufosinate e glyphosate, respectivamente.

Os herbicidas utilizados foram; Sanson®, contendo 40 g L⁻¹ de 2-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)-N,N-dimethylnicotinamide 40 gL⁻¹

(nicosulfuron). Para o glufosinato de amônio foi usado o Finale[®], com 200 g L⁻¹ de ammonium 4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]-DL-homoalaninate ou ammonium DL-homoalanin-4-yl(methyl)phosphinate (ammonium glufosinate). E o atrazine utilizou-se o Primóleo[®] com 400 g L⁻¹ de 6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine.

Preparo das áreas e aplicação dos herbicidas

Para o preparo do solo, as áreas foram demarcadas com nivelamento inferior a 3%, aradas e gradeadas. Foi aplicado o herbicida glyphosate em pré-plantio em dose de 1200 g ha⁻¹ para dessecação. A área de cada parcela foi de 10m x 2,5m. O solo foi adubado com 92,5 kg ha⁻¹ de 4-14-8 (N-P₂O₅-K₂O) no plantio e 43,97 kg ha⁻¹ de 22-00-20 (N-P₂O₅-K₂O) em cobertura aos quarenta dias após o plantio, suplementado com 45 kg ha⁻¹ de sulfato de amônio (22% de N) cinquenta dias após o plantio.

Os genótipos de milho foram semeados em espaçamento de 0,5m entre linhas e 0,36 m entre plantas. A unidade experimental foi constituída por cinco linhas de oito metros, com área útil de 12 m². Utilizou-se o sistema por aspersão para irrigação com haste de 1,5m, com turno de rega em intervalos de 24 horas.

Os herbicidas foram aplicados no trigésimo dia após a semeadura, quando as plantas de milho apresentaram quatro folhas totalmente expandidas. Foram aplicados com pulverizador de ar comprimido acionado pneumaticamente, com bocal de jato plano TT11002. Volume de pulverização de 150 L ha⁻¹. As doses aplicadas foram: 400 g ha⁻¹ de ammonium glufosinate, 2400 g ha⁻¹ de atrazine e 60 g ha⁻¹ de nicosulfuron.

Avaliações

Avaliações fisiológicas das plantas foram realizadas aos sete e quatorze dias após a aplicação dos herbicidas. As medições foram realizadas no terço médio da folha adulta, correspondente à quarta ou quinta folha totalmente expandida contando do meristema apical para a base. As medições da fluorescência da clorofila foram realizadas conforme metodologia proposta por (Ferreira et al., 2015). Foram avaliadas fluorescência inicial da *clorofila a* (F0 – elétrons quantum⁻¹), fluorescência máxima (Fm – elétrons quantum⁻¹), a razão entre a fluorescência variável e fluorescência máxima da *clorofila a* (Fv/Fm) e a taxa de transporte de elétrons (ETR – μmols elétrons m⁻² s⁻¹). As

medidas da curva de saturação foram feitas na superfície adaxial das folhas com um fluorômetro de clorofila portátil JUNIOR-PAM (Fluorômetro de clorofila modulada em amplitude de pulso/ Walz Teaching-PAM- Germany) equipado com 1,5-fibra óptica de diâmetro mm e um diodo azul (485 ± 40 nm) fonte de luz (Wongpattnakul et al., 2015).

Completados 100 dias após a semeadura, quando as plantas estavam no estágio R5, seis plantas centrais foram coletadas em cada parcela e cortadas a 30 cm em relação ao solo. As plantas foram pesadas e processadas em ensiladores mecanizados, fragmentando-as em pedaços de 2 cm, que foram secas em estufa com ventilação forçada a 65°C, por 72h. Após, o material foi moído em moinho de faca tipo Willy e peneirados em malha de 2 mm. Para a composição químico-bromatológicas foram determinados os teores de matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), digestibilidade da matéria seca (DMS), nutrientes disponíveis totais (NDT) e proteína bruta (PB) conforme metodologia proposta por Van Soest, (1991).

A qualidade e produtividade de grãos foram avaliadas no final do ciclo, quando os grãos encontravam-se no estágio R6. As plantas e as espigas da parcela útil foram contadas. Foram colhidas 20 espigas na parcela útil e despalhadas, secas e debulhadas. Os grãos foram pesados com estimativa de rendimento em [$t\ ha^{-1}$], o estande de plantas; número de plantas remanescente também foram avaliados. O número de espigas foi considerado apresentado nas plantas da parcela útil, sendo transformado para número de espigas ha^{-1} . Foi também calculado o número de grãos por espiga.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância, quando significativos as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$) de probabilidade de erro, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2014).

Resultados

Fluorescência da clorofila *a*

Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os genótipos de milho GM com os herbicidas aplicados sobre as variáveis fisiológicas; fluorescência inicial (F_0), Taxa

de transporte de elétrons (ETR) para a primeira época de avaliação (7 DAP). Observou-se média de 2062 elétrons quantum^{-1} para Fm, e 0,74 para Fv/Fm ao 7 DAP. O isohíbrido apresentou maior valor de Fo sob efeito de ammonium glufosinate. Sob efeito de atrazine e nicosulfuron, as aplicações não causaram sintomas de estresse sobre os genótipos aos 7 dias (Figura 02).

Desdobrando-se a interação entre genótipos e herbicidas para a variável ETR, verificou-se que o isohíbrido obteve a menor média, $14,86 \mu\text{mols elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Houve redução na taxa de transporte de elétrons no genótipo Herculex com atrazine. Para o PowerCore houve aumento na ETR com aplicação do atrazine e nicosulfuron (7DAP) (Figura 01).

Na segunda avaliação (14 DAP) as plantas apresentaram sinais de recuperação dos efeitos da aplicação dos herbicidas. Para as variáveis Fo, Fv/Fm, ETR não foram observadas diferenças entre os genótipos sob efeito dos herbicidas atrazine e nicosulfuron. Já aumento no Fo para Herculex, PowerCore e isohíbrido sob efeito do ammonium glufosinate, conseqüentemente, queda na ETR e Fv/Fm para todos os genótipos (Figura 02). As plantas GM (PowerCore e Herculex), tolerantes ao herbicida ammonium glufosinate, também apresentaram menores valores para as variáveis analisadas, sugerindo efeito negativo do herbicida sobre essas plantas.

Composição químico-bromatológica das plantas de milho GM

Para composição químico-bromatológica das plantas, nenhuma diferença foi encontrada entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os herbicidas atrazine, nicosulfuron e ammonium glufosinate não afetam o teor de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), digestibilidade da matéria seca (DMS), nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína bruta total (PB) (Tabela 01).

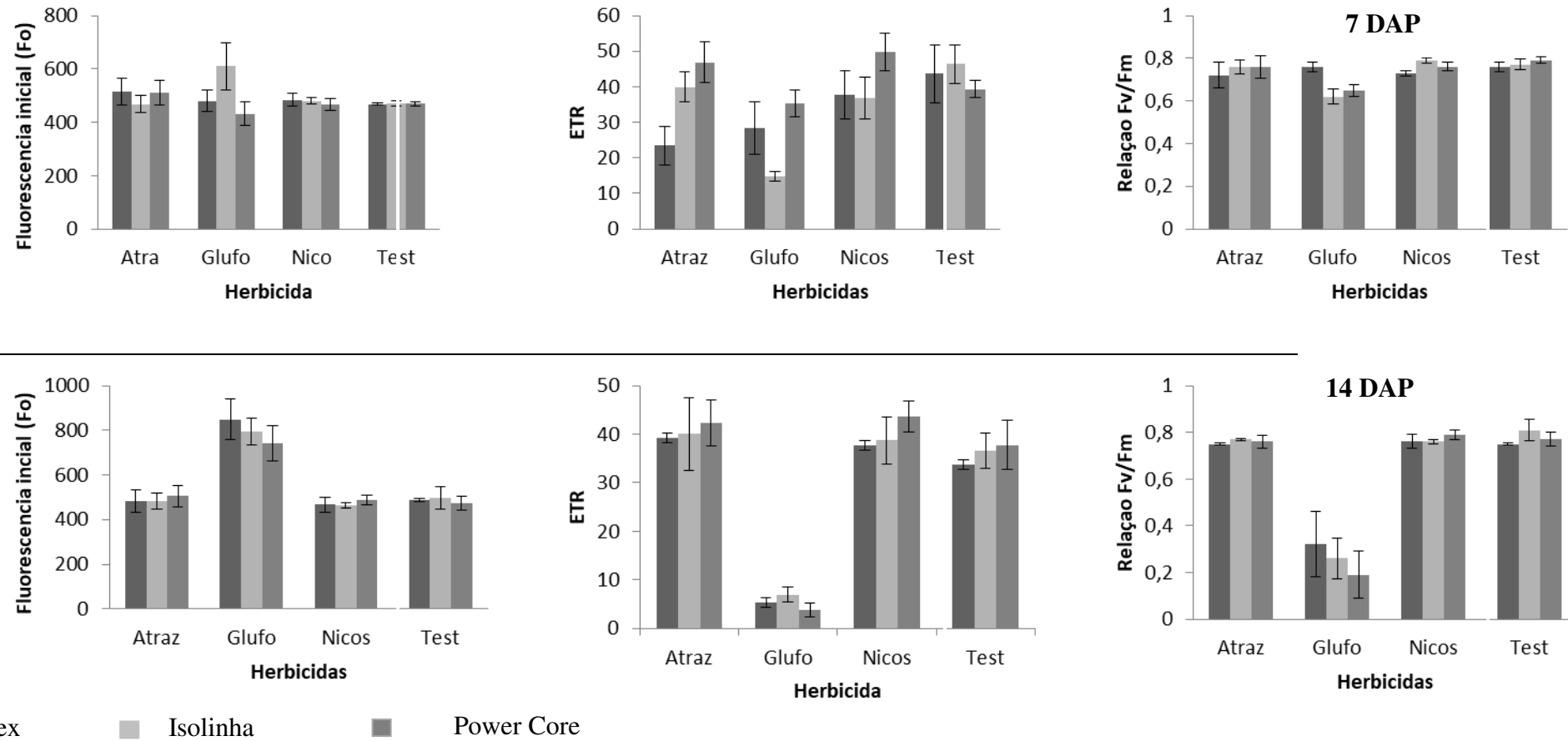


Figura 03. Fluorescência inicial da clorofila a (F_o) (elétrons quantum⁻¹); Relação fluorescência variável/fluorescência máxima (F_v/F_m) e taxa de transporte de elétrons (ETR) ($\mu\text{mols elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em plantas de milho transgênico submetidos à aplicação de herbicidas atrazine (Atra), ammonium glufosinate (Glufo) nicosulfuron (Nicos) e na ausência de herbicidas (Test).

Produtividade e qualidade de plantas

Os herbicidas e genótipos estudados exerceram efeito significativo sobre o número de plantas ha^{-1} , número de espigas ha^{-1} , número de grãos por espigas, massa fresca de plantas, massa seca das plantas e produtividade de grãos ($p < 0,05$). O isohíbrido sob efeito do ammonium glufosinate apresentou redução do estande para 19.999 mil plantas ha^{-1} comparados a média geral dos demais tratamentos. Os demais genótipos apresentaram média geral de 40.378 plantas ha^{-1} (Figura 03).

O número de espigas foi menor para os genótipos de milho tratados com atrazine, sendo 31.666 espigas ha^{-1} para Herculex e média de 35.416 ha^{-1} para demais genótipos. O isohíbrido, sensível ao ammonium glufosinate, produziu 21.666 espigas ha^{-1} , sob efeito desse herbicida (Figura 03). O número de grãos por espiga foi diminuído para 151 nas plantas do isohíbrido sob efeito do ammonium glufosinate. Para os demais tratamentos, o número médio de grãos por espiga foi 439 (Figura 02). O peso fresco das plantas do isohíbrido foi 70% menor sob efeito do ammonium glufosinate em relação aos demais tratamentos (Figura 03). A matéria seca do isohíbrido foi comprometida sob efeito do ammonium glufosinate produzindo 2,74 t ha^{-1} . Os efeitos negativos do ammonium glufosinate sobre o isohíbrido diminuíram a produtividade de grãos para 0,7 t ha^{-1} . Os demais tratamentos obtiveram média de 5.56 t ha^{-1} (Figura 03).

Tabela 01. Matéria seca da massa seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), digestibilidade da matéria seca (DMS), nutrientes disponíveis totais (NDT) e proteína bruta de plantas de milho GM sob efeito de herbicidas.

	Herculex	Isohíbrido	Power Core
Herbicidas		MS (%)	
Atrazine	95,39 ± 0,54	95,19 ± 0,36	95,09 ± 0,12
Glufosinate	95,59 ± 1,01	95,48 ± 0,17	95,42 ± 0,60
Nicosulfuron	96,05 ± 0,14	96,00 ± 0,09	95,41 ± 0,42
Controle	95,51 ± 0,36	95,78 ± 0,42	96,01 ± 0,24
		MO (%)	

Atrazine	95,61 ± 0,59	95,60 ± 0,67	95,46 ± 0,22
Glufosinate	95,57 ± 1,29	94,96 ± 0,24	95,50 ± 0,90
Nicosulfuron	95,74 ± 0,30	95,18 ± 0,72	95,94 ± 0,66
Controle	95,49 ± 0,65	96,34 ± 0,22	96,07 ± 0,73
FDN (%)			
Atrazine	45,27 ± 2,66	43,92 ± 7,50	44,09 ± 4,58
Glufosinate	43,95 ± 3,32	50,00 ± 0,62	44,35 ± 0,49
Nicosulfuron	42,54 ± 1,04	42,19 ± 3,86	43,27 ± 2,99
Controle	45,35 ± 1,68	40,33 ± 2,15	39,52 ± 6,70
FDA (%)			
Atrazine	19,16 ± 1,96	18,22 ± 0,93	18,77 ± 0,49
Glufosinate	18,08 ± 1,45	23,36 ± 7,81	19,41 ± 2,80
Nicosulfuron	17,75 ± 1,06	16,81 ± 1,91	18,35 ± 1,99
Controle	18,84 ± 1,58	15,47 ± 0,67	14,41 ± 0,29
DMS (%)			
Atrazine	73,96 ± 1,12	74,70 ± 6,08	74,27 ± 2,19
Glufosinate	74,80 ± 1,52	70,70 ± 0,73	75,80 ± 0,39
Nicosulfuron	75,06 ± 0,83	75,80 ± 1,49	74,60 ± 1,54
Controle	74,21 ± 1,23	76,84 ± 0,52	77,60 ± 4,36
NDT (%)			
Atrazine	74,41 ± 1,01	75,80 ± 5,47	74,70 ± 1,97
Glufosinate	75,17 ± 1,37	71,48 ± 0,65	74,25 ± 0,35
Nicosulfuron	75,41 ± 0,75	76,06 ± 1,34	74,98 ± 1,39
Controle	74,64 ± 1,10	77,00 ± 0,47	77,24 ± 3,91
PB (%)			
Atrazine	11,19 ± 0,58	11,59 ± 0,65	11,63 ± 0,39
Glufosinate	11,83 ± 0,79	12,00 ± 0,36	11,24 ± 0,41
Nicosulfuron	11,24 ± 0,95	11,70 ± 0,56	12,11 ± 0,62
Controle	11,55 ± 0,68	11,58 ± 0,77	11,95 ± 1,22

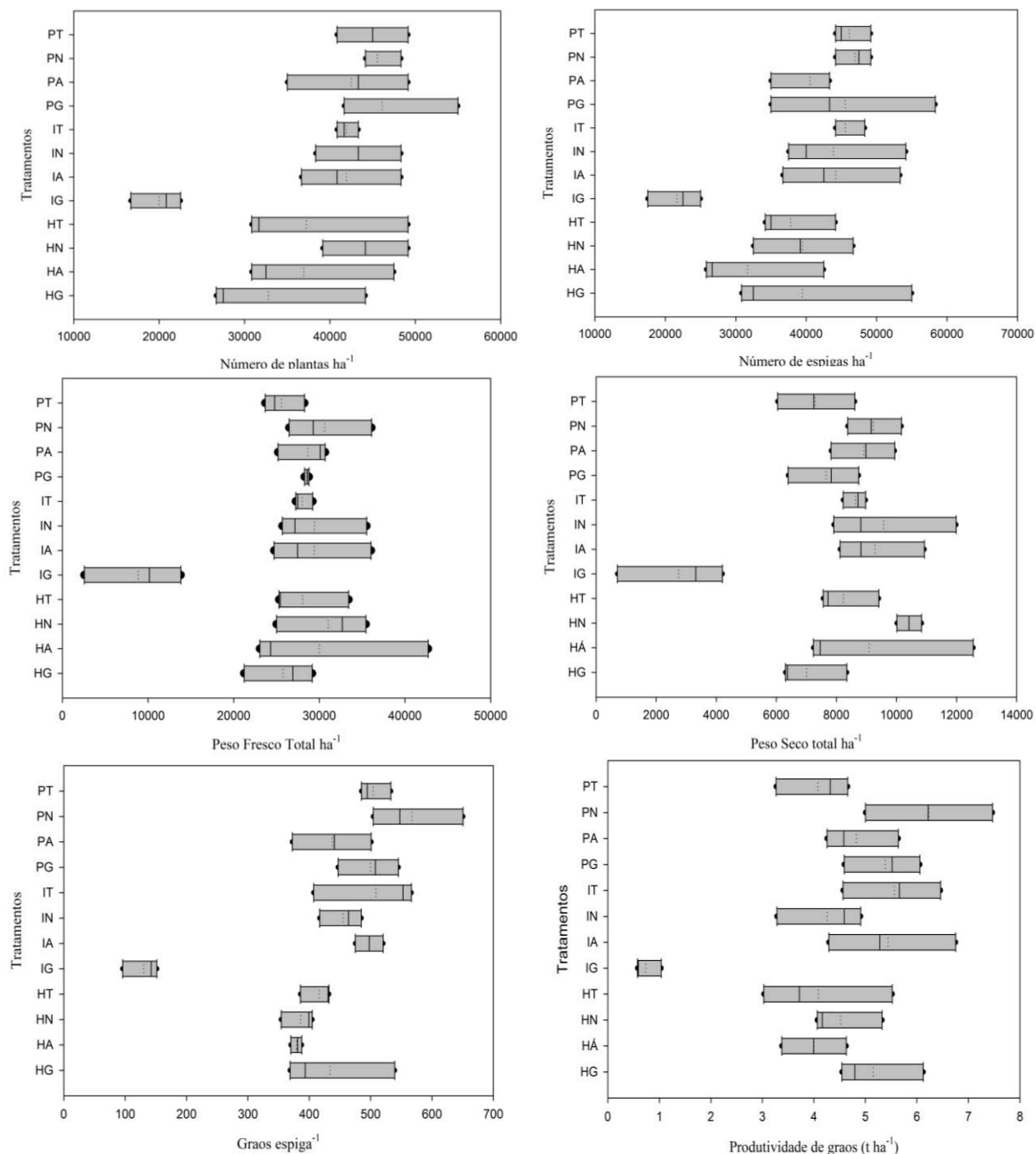


Figura 04. Número de plantas ha^{-1} e de espigas ha^{-1} , peso fresco e seco ha^{-1} , produtividade (t ha^{-1}) e número de grãos por espiga de plantas de milho GM sob efeito de herbicidas. PT: Power Core + testemunha; PN: Power Core + nicosulfuron; PA: Power Core + atrazine; PG: Power Core + ammonium glufosinate; IT: isolinha + testemunha; IN: isolinha + nicosulfuron; IA: isolinha + atrazine; IG: isolinha + ammonium glufosinate; HT: Herculex + testemunha; HN: Herculex + nicosulfuron; HA: Herculex + atrazine; HG: Herculex +

ammonium glufosinate. Cada barra representa um tratamento, sendo que no interior de cada barra a linha contínua representa a média global para cada tratamento e a linha pontilhada representa a mediana entre os valores máximo e mínimo de cada parcela.

Discussão

Fluorescência da clorofila *a* de plantas de milho

A fluorescência inicial (F_0) da *clorofila a* evidencia a fluorescência quando a quinona (QA) receptora primária de elétrons do fotossistema II (PSII) está totalmente oxidada e o centro de reação (P680) está “ativo”, indicando o início das reações fotoquímicas (Baker e Rosenqvst, 2004). Dessa forma, o aumento excessivo de F_0 nas plantas de milho ou diminuição na capacidade de transferência de energia de excitação do complexo antes e revela destruição do centro de reação do PSII. Os maiores valores de F_0 observados para o isohíbrido na primeira e segunda avaliações com o ammonium glufosinate eram esperados (Figura 02). O acúmulo de amônio na planta causada pelo herbicida destrói a célula vegetal. A fotossíntese é severamente inibida. O amônio reduz o gradiente de pH através da membrana, o que pode desacoplar a fotofosforilação (Jalaludin et al., 2010).

Os valores de F_0 encontrados para a primeira e segunda avaliação de plantas sob efeito dos herbicidas atrazine e nicosulfuron demonstram tolerância dos genótipos de milho. Esses resultados indicam que a transformação genética sofrida por esses genótipos não afetou sua tolerância. A tolerância das plantas de milho ao herbicida atrazine está relacionada ao grupo de enzimas denominadas Glutathione S-Transferase (GTS). Essas enzimas em plantas são responsáveis pela catalisação e desintoxicação de herbicidas em várias outras culturas e plantas daninhas. Em milho as enzimas desintoxicam as plantas por meio da conjugação de glutathione (Cho e Kong, 2007). Como observado, tanto os genótipos transgênicos quanto o isohíbrido apresentaram tolerância à aplicação do atrazine. Estudos recentes demonstraram que a aplicação dos herbicidas metolachlor, dichlormid, primisulfuron e atrazine induziram a expressão dos genes ZmGST27 e ZmGT1, que são responsáveis pela codificação da enzima glutathione S-transferase (GTS) e um dos transportadores de glutathione em plantas de milho (Pang et al., 2012).

A introdução de genes e o processo de transformação gênica para a obtenção de plantas GM são rigorosamente estudadas para evitar problemas causados pelos desvios nos genomas das plantas durante o processo. Esses desvios podem ser causados pela variação somaclonal ou mutações espontâneas ocorridas durante a cultura de tecidos (Schouten et al., 2017). Com os resultados observados nessa pesquisa é possível afirmar que a transformação gênica não afetou a expressão dos genes envolvidos na tolerância ao atrazine a partir da enzima GTS. Esses resultados também confirmados por meio da relação entre a fluorescência variável e máxima (Fv/Fm).

Na segunda avaliação não foi observada diferença entre os tratamentos herbicidas em relação à testemunha para Fv/Fm com os herbicidas atrazine e nicosulfuron. O valor da razão Fv/Fm é proporcional ao rendimento quântico da fase fotoquímica da fotossíntese (Butler e Kitajima, 1975). E o valor ideal encontra-se na faixa de (0,75-0,85). O declínio da relação Fv/Fm é um bom indicador do dano fotoinibitório quando plantas estão sujeitas a estresses do ambiente (seca e frio, por exemplo) proporcionado por poluentes, herbicidas ou ataque de pragas (Catunda et al., 2005 e Ferreira et al., 2015).

O nicosulfuron promoveu leve estresse (Fv/Fm) na primeira avaliação das plantas do genótipo Herculex. Fitointoxicação após a aplicação de nicosulfuron em genótipos de milho não transgênico foram relatadas para híbridos B551, Ocepar705, Penta e AG7000 (Cavaliere et al., 2008), para o híbrido Pioneer 3072 (LópezOvejero et al., 2003) e para o híbrido DKB390 RR transgênico com tolerância ao glyphosate (Correia et al., 2013). Em todas as situações relatadas, as plantas se recuperaram dos sintomas.

A recuperação das plantas do genótipo Herculex após estresse causado pela aplicação do atrazine e nicosulfuron foi observada. A redução nos valores de ETR foram também encontrados após a aplicação do ammonium glufosinate na dose de 400 g ha⁻¹, com recuperação após a aplicação em algodão Widestrike® (FM 975WS/ *pat* / Dow Agrosience) resistente ao ammonium glufosinate (Carbonari et al., 2016). Um dos efeitos secundários da resposta fitotóxica ao ammonium glufosinate é a redução da ETR fotossintética (Carbonari et al., 2016).

Composição químico-bromatológica de plantas

Em relação à composição químico-bromatológica das plantas, o teor de FDN é indicativo da quantidade total de fibra do volumoso, estando diretamente relacionada ao

consumo pelos animais. Já FDA relaciona-se à digestibilidade da forragem, pois contém a maior proporção de lignina, que é a fração da fibra completamente indigestível, indicando assim, sua indigestibilidade. Além disso, também é um indicador do valor energético do material, ou seja, quanto menor a FDA, maior será o valor energético da forragem (Rosa et al., 2004; Oliveira et al., 2010). Valores de FDA entre 24,2 e 29% foram observados entre genótipos de milho (AGN-3150 e CD-302) por Pinto et al. (2010), valores superiores ao encontrado nos genótipos sob efeito de herbicidas aqui avaliados. Os valores de FDA e FDN do presente trabalho podem ser considerados ideais para a produção de silagens, com características qualitativas para a produção de silagem de milho.

As frações FDN e FDA quando em níveis elevados, acima dos valores obtidos, comprometem o consumo e o aproveitamento da forragem. Para silagem de milho, considera-se um bom nível de FDA abaixo de 50%. E para o FDN valores acima de 50% comprometem a qualidade do material (Moraes, 2008). É importante salientar que a FDN é uma característica que está diretamente relacionada à velocidade de passagem do alimento pelo trato digestivo. Menores níveis de FDN, maior o consumo de MS. Da mesma forma, o teor de FDN está relacionado a fatores como o ciclo da cultivar, temperaturas noturnas, teor de carboidratos solúveis, entre outros (Oliveira et al., 2010). Atrazine e nicosulfuron não afetaram os valores de FDN e FDA dos genótipos GM avaliados.

Para uma silagem de boa qualidade os níveis de NDT devem estar entre 64 a 70% de NDT (Keplin, 1992). Os níveis de NDT neste trabalho foi de 74%, valor acima dos níveis recomendados para produção de silagem. Apesar dos valores encontrados neste no presente estudo considera-se que os genótipos utilizados não sofreram deterioração na qualidade nutricional. A determinação dos nutrientes digestíveis totais (NDT) em silagens ou em qualquer outro alimento é de extrema importância para o balanceamento e a otimização de dietas (Cappelle et al., 2001). Os valores para a matéria orgânica (MO) também não diferiram entre os tratamentos, com média de 95%.

O ammonium glufosinate age impedindo a conversão do amônio em glutamato, aminoácido importante na formação protéica. Contudo, a aplicação de ammonium glufosinate não alterou a quantidade de proteína bruta (PB) entre os genótipos, mesmo para o isohíbrido. Os principais sintomas que as plantas mostram após a aplicação de ammonium glufosinate são rápida clorose do tecido tratado, seguido de necrose e morte das plantas após poucos dias (Brunharo et al., 2014). No entanto, as plantas do isohíbrido remanescentes da aplicação do ammonium glufosinate apresentaram níveis semelhantes

aos demais genótipos para PB, porém, com redução na produção. Sugere-se que é necessária maior dose do ammonium glufosinate para o controle completo das plantas remanescentes do isohíbrido, devido o estágio fenológico que as plantas de milho estavam no momento da aplicação do herbicida.

Com esses resultados é possível perceber a qualidade dos genótipos estudados para o uso como material vegetal na produção de silagem de boa qualidade. A transformação genética não reduziu as características agrônômicas desses materiais ou a sensibilidade a atrazine e nicosulfuron. Em regiões com ocorrências de plantas daninhas de difícil controle, com resistência aos herbicidas como glyphosate ou ammonium glufosinate, a aplicação de atrazine, nicosulfuron não comprometem a qualidade das plantas de milho Herculex e PowerCore

Produtividade e qualidade de plantas de milho

Os resultados encontrados para o estande de plantas estão correlacionados com o espaçamento adotado, (0,5 m entre linhas e 0,35 m entre plantas) (Figura 03). Esperava-se com o espaçamento adotado uma população média de 55.000 plantas ha⁻¹. A população recomendada para maximizar o rendimento dos grãos de milho varia entre 40.000 e 80.000 plantas ha⁻¹. A produtividade média dos genótipos foi 20% superior àquela estimada pela CONAB para a segunda safra 2016 do milho no Brasil (CONAB, 2017).

A diferença entre os genótipos quanto à sensibilidade aos herbicidas avaliados merece destaque. A redução na densidade de plantas no isohíbrido sob efeito do herbicida ammonium glufosinate evidencia a sensibilidade das plantas de milho ao herbicida.

A aplicação de atrazine e nicosulfuron não reduziu o estande de plantas, embora esses herbicidas já sejam recomendados na cultura do milho há décadas. Entretanto, até o presente momento, poucos trabalhos avaliaram o efeito sobre genótipos transgênicos com tolerância ao ammonium glufosinate. Os resultados confirmam a tolerância mantida no milho após a introdução dos genes de resistência. Pesquisas avaliaram o efeito do atrazine e nicosulfuron sobre milho glyphosate-resistente (Correia et al., 2013). O número de espigas foi menor em plantas da isolinha tratadas com ammonium glufosinate, efeito esperado pela intolerância ao herbicida.

Atrazine e nicosulfuron não afetaram a produtividade dos genótipos de milho. A seletividade do milho ao atrazine pode ser explicada pela ação da enzima glutathione-S-

transferase (GST) (Li et al., 2017). As enzimas do grupo da GST são enzimas multifuncionais que catalisam a conjugação de glutathione (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) para vários substratos para formar um produto *S*-glutathionilado polar (Yuan et al., 2007).

O metabolismo dos herbicidas nas plantas geralmente requer a ação de vários grupos de enzimas, que vão direcionar as diferentes reações metabólicas. As principais enzimas envolvidas na tolerância ao nicosulfuron são as do complexo citocromo P450s e hidrolisadas por carboxilesterases, com conjugação por glutathione ou glicosiltransferases (Riechrs et al., 2010). Assim, acredita-se que a tolerância dos genótipos de milho ao nicosulfuron seja mediada pela ação desses grupos enzimáticos e não foi afetada pela transformação gênica. A aplicação de nicosulfuron em pós-emergência possibilita melhor controle de plantas daninhas, garantindo maior produtividade do milho, independente da cultura de cobertura ou do manejo adotado. Isso decorre principalmente devido a supressão de gramíneas que, quando controladas possibilitam que as plantas de milho expressem seu potencial genético (Moraes et al., 2013).

Por outro lado, com a ação do ammonium glufosinate sobre o isohíbrido, a formação da glutamina a partir de glutamato é impedida, levando à acumulação de amônio a níveis tóxicos nas plantas, causando a destruição celular e morte da planta (Devos et al., 2008). Com isso, a redução da massa fresca e seca das plantas sensíveis é evidente. Em outra pesquisa a aplicação de ammonium glufosinate causou redução em 94 a 98% na biomassa de plantas de milho resistente ao glyphosate (Shauck e Smed, 2012). A petição para a determinação do nível regulamentado da proteína Bt Cry1F resistente a insetos e tolerante ao ammonium glufosinate em 2000 foi pedida pelo serviço de Inspeção de Saúde Animal e Vegetal e realizada pelo departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Os resultados sustentaram a conclusão de que não existem diferenças agrônomicas entre os genótipos cujo evento 1507 (Heculex) transgênico do genótipo não transgênico (isohíbrido), em nível de rendimento, umidade, densidade de grãos, altura de plantas, etc (USDA APHIS, 2000). Tanto o evento Herculex quanto o PowerCore, conceberam sua composição do evento 1507, e esses genótipos mesmo na presença dos herbicidas atrazine e nicosulfuron não apresentaram alterações em nível de rendimentos. Portanto, até o presente momento não há indícios de efeitos adversos da utilização do atrazine e nicosulfuron em sistema de manejo de milho resistente ao ammonium glufosinate.

Os resultados obtidos com esse trabalho permitiram concluir que a aplicação dos herbicidas atrazine, nicosulfuron e ammonium glufosinate não afetaram a composição

químico-bromatológico plantas dos genótipos Herculex e PowerCore para silagem e rendimento dos grãos de milho. Assim os herbicidas podem ser utilizados com eficiência em programas de manejo de plantas daninhas em milho resistente ao ammonium glufosinate de amônio.

Referências

Baker, N. R., Rosenqvist, E. 2004. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55(403): 1607-21.

Beckie, H.J., Hall, L.M. 2014. Genetically-modified herbicide-resistant (GMHR) crops a two-edged sword? An Americas perspective on development and effect on weed management. *Crop Protection* 66: 40-45.

Benbrook, C.M. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe* 28:3.

Brookes, G., Barfoot, P. 2017. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996–2015: Impacts on pesticide use and carbon emissions. *GM Crops & Food* 8: 117-47.

Brunharo, C. A. C. G., Christoffoleti, P. J., Nicolai, M. 2014. Aspectos do mecanismo de ação do amônio glufosinate: culturas resistentes e resistência de plantas daninhas. *Revista Brasileira de Herbicidas* 13(2): 163-77.

Butler, W.L., Kitajima, M. 1975. A tripartite model for chloroplast fluorescence, in: *Proceedings of the Third International Photosynthesis Congress-Israel* 1: 13-14.

Carbonari, C.A., Latorre, D.O., Gomes, G.L.G.C., Velini, E.D., Owens, D.K., Pan, Z., Dayan, F.E. 2016. Resistance to glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in LibertyLink® and WideStrike® cotton. *Planta* 243: 925-33.

Catunda, M. G., Freitas, S. P., Oliveira, J. G., Silva, C. M. M. 2005. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). *Planta Daninha*. 23(1): 115-21.

Cappelle, E.R., Valadares Filho, S.C., Silva, J.F.C., Cecon, P.R. 2001. Estimativas do valor energético a partir de características químicas e bromatológicas dos alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30(6): 1837-56.

Cavaliere, S.D., Oliveira Junior, R.S., Constantin, J., Biffe, D.F., Rios, F.A., Franchini, L.H.M. 2008. Tolerância de híbridos de milho ao nicossulfuron. *Planta Daninha* 26(1): 203-14.

Cerqueira, D.T.R. De, Schafer, A.C., Rápido, B.J., Herman, R.A. 2017. Agronomic Performance of Insect-Protected and Herbicide-Tolerant MON 89034 × TC1507 × NK603 × DAS-40278-9 Corn Is Equivalent to That of Conventional Corn. *GM Crops&Food* 8: 149-55.

Cho, H.Y., Kong, K.H. 2007. Study on the biochemical characterization of herbicide detoxication enzyme, glutathione S-transferase. *Biofactors* 30(04): 281-87.

CONAB -Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamentos de Safra. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>> acesso em Julho de 2016.

Correia, N.M., Santos, E.A. 2013. Teores foliares de macro e micronutrientes em milho tolerante ao glyphosate submetido à herbicidas. *Semina* 34 (6): 3165-72.

Coupe, R.H., Capel, P.D. 2016. Trends in pesticide use on soybean, corn and cotton since the introduction of major genetically modified crops in the United States. *Pest Management Science* 72(5): 1013-22.

Dong, F., Mitchell, P.D., Davis, V.M., Recker, R., 2017. Impact of atrazine prohibition on the sustainability of weed management in Wisconsin maize production. *Pest Management Science* 73, 425–434.

Devos, Y., Cougnon, M., Vergucht, S., Bulcke, R., Haesaert, G., Steurbaut, W., Reheul, D. 2008. Environmental impact of herbicide regimes used with genetically modified herbicide-resistant maize. *Transgenic Research* 17: 1059-77.

Ferreira, D.F., 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência Agrotécnica* 38(2), 109-112.

Ferreira, E.A., Matos, C.C., Barbosa, E.A., Silva, D.V., Santos, J.B., Pereira, G.A.M., Faria, A.T., Silva, C.T. 2015. Respostas fisiológicas da mandioca à aplicação de herbicidas. *Semina* 36(2): 645-56.

Heap, I. 2017. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Friday, October 7, 2017. Disponível: <http://www.weedscience.com/Summary/MOA.aspx>.

Hou, X., Huang, X., Ai, Z., Zhao, J., Zhang, L., 2017. Ascorbic acid induced atrazine degradation. *Journal of Hazardous Materials* 327, 71–78.

Jalaludin, A., Ngim, J., Bakar, B.H.J., Alias, Z. 2010. Preliminary findings of potentially resistant goosegrass (*Eleusine indica*) to glufosinate ammonium in Malaysia, *Weed Biology and Management* 10: 256-60.

Jalaludin, A., Yu, Q., Zoellner, P., Beffa, R., Powles, S.B. 2017. Characterisation of glufosinate resistance mechanisms in *Eleusine indica*. *Pest Management Science* 73(6): 1091-100.

Keplin, L.A.S. 1992. Recomendação de sorgo e milho (silagem) safra 1992/93. Encarte Técnico da Revista Batavo. CCLPL, Castro, PR. Ano I, n.8: 16-19.

Krenchinski, F.H., Albrecht, A.J.P., Cesco, V.J.S., Rodrigues, D.M., Pereira, V.G.C., Albrecht, L.P., Carbonari, C.A.; Filho, R.V. 2018. Post-emergent applications of isolated and combined herbicides on corn culture with cp4-epsps and pat genes. *Crop Protection* 106: 156-62.

Li, D., Gao, Q., Xu, L., Pang, S., Liu, Z., Wang, C., Tan, W. 2017. Characterization of glutathione S-transferases in the detoxification of metolachlor in two maize cultivars of differing herbicide tolerance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 143: 265-71.

Liu, X., Xu, X., Li, B., Yao, X., Zhang, H., Wang, G., Han, Y. 2018. *Journal of Integrative Agriculture* 17(8): 1790-1799.

López-Ovejero, R. F., Fancelli, A. L., Dourado-Neto, D., García Y García, A., Christoffoleti, P. J. 2003. Seletividade de herbicidas para a cultura de milho (*Zea mays* L.) aplicados em diferentes estádios fenológicos da cultura. *Planta Daninha* 21(3): 413-419.

Manalil, S., Onoriode, C., Werth, J., Chauhan, B.S. 2017. Weed management in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through weed-crop competition: A review. *Crop Protection* 95: 53-59.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA- Sistema de Agrotóxicos

Fitossanitários - Agrofit. 2018. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: abril de 2018.

Moraes, G.J., Costa, C., Meirelles, P.R.L., Oliveira, K., Factori, M.A., Rosales, L.A., Santos, T.A.B. 2008. Produtividade e valor nutritivo de plantas de milho de textura dentada ou dura em tres estádios de colheita para silagem. Boletim da Indústria Animal 65(2): 155-66.

Moraes, S. D., Jobim, C.C., Silva, M.S., Marquardt, F.I. 2013. Produção e composição química de híbridos de sorgo e de milho para silagem, Revista Brasileira Saúde Produção Animal 14(4): 624-34.

Nicolia, A., Manzo, A., Veronesi, F., Rosellini, D. 2014. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. Critical Reviews in Biotechnology 34(1): 77-88.

Oliveira, L.B., Pires, A.J.V., Viana, A.E.S., Matsumoto, S.N., Carvalho, G.G.P., Ribeiro, L.S.O. 2010. Produtividade, composição química e características agronômicas de diferentes forrageiras. Revista Brasileira de Zootecnia 39(12): 2604-10.

Owen, M.D.K., Beckie, H.J., Leeson, J.Y., Norsworthy, J.K., Steckel, L.E. 2014. Integrated pest management and weed management in the United States and Canada. Pest Management Science 71(3): 357-76.

Owen, M.D.K. 2016. Diverse approaches to herbicide-resistente weed management. Weed Science 64(1): 570-84.

Pang, S., Duan, L., Liu, Z., Song, X., Li, X., Wang, C. 2012. Co-Indução de uma glutationa-S-transferase, um transportador de glutationa e um transportador ABC no milho pela Xenobiotics. PLOS ONE 7(7): e40712.

Pinto, A.P., Lançanova, J.A.C.L., Lugao, S.M.B., Roque, A.P., Abrahao, J.J.S., Oliveira, J.S., Leme, M.C.J., Mizubuti, I.Y. 2010. Avaliação de doze cultivares de milho (*Zea mays* L.) para silagem, Semina 31(4): 1071-78.

Riechers, D. E., Kreuz, K., Zhang, Q. 2010. Detoxification without Intoxication: Herbicide Safeners Activate Plant Defense Gene Expression. Plant Physiology 153(1): 3-13.

Rosa, J. R. P., Silva, J. H. S., Restle, J., Pascoal, L. L., Brondani, I. L., Alves Filho, D. C., Freitas, A. K. 2004. Avaliação do comportamento agrônômico da planta e valor nutritivo da silagem de diferentes híbridos de milho (*Zea mays*, L.) Revista Brasileira de Zootecnia 33(2): 302-312.

Schouten, H.J., Geest, H., Vande Papadimitriou, S., Bemer, M., Schaart, J.G., Smulders, M.J.M., Perez, G.S., Schijlen, E. 2017. Re-sequencing transgenic plants revealed rearrangements at T-DNA inserts, and integration of a short T-DNA fragment, but no increase of small mutations elsewhere. PlantCellReports 36(3): 493-04.

Shaner, D. L., Lindenmeyer, R. B., Ostlie, M. H. 2012. What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? Pest Management Science 68(1): 3-9.

Shauck, T.C., Smeda, R.J. 2012. Control of Glyphosate-Resistant Corn (*Zea mays*) with Glufosinate or Imazethapyr plus Imazapyr in a Replant Situation. Weed Technology 26(3): 417-21.

Sun, L., Wu, R., Su, W., Gao, Z., Lu, C., 2017. Physiological basis for isoxadifen-ethyl induction of nicosulfuron detoxification in maize hybrids. PLOS ONE 12, e0173502.

USDA APHIS, 2000. Petition for determination of nonregulated status B.T. Cry1F insect resistente, glufosinate tolerant maize line. Washington DC: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Serviço de Inspeção de Saúde Animal e Vegetal. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/00_13601p.pdf.

Wang, D.F., Pang, X.J., Yang, F., Kou, L.S., Zhang, X., Yu, P.X., Niu, Y.B. 2017. Antioxidative enzymes, calcium, and ABA signaling pathway are required for the stress tolerance of transgenic wheat plant by the ectopic expression of harpin protein fragment Hpa1₁₀₋₄₂ under heat stress. Russian Journal Plant Physiology 64(6): 899-905.

Wongpattanakul, P., Ritchie, R.J., Koedsin, W., Suwanpravit, C. 2015. Photosynthetic Rates in Mangroves. International Conference on Plant Marine and Environmental Sciences 1-2.

Yuan, J., Tranel, P.J., Stewart Jr. C.N. 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. Trends in Plant Science 12: 6-13.

Van Soest, P. J., Roberttson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science. 74(2): 3583- 97.

ARTIGO CIENTÍFICO II

HERBICIDAS AFETAM A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE PLANTAS DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADAS?

Resumo: A rotação de herbicidas reduz a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes, mas efeitos desses compostos em genótipos geneticamente modificados são pouco conhecidos. O objetivo foi avaliar a atividade de enzimas antioxidantes dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) em genótipos de milho geneticamente modificados, tolerantes ao ammonium glufosinate, após aplicação dos herbicidas atrazine, nicosulfuron e ammonium glufosinate. Os herbicidas foram aplicados sobre os genótipos de milho GM, Herculex® (TC1507) e PowerCore® (MON8934 x TC1507 x NK603) e um isohíbrido (controle). A atividade oxidativa das enzimas APX, CAT e SOD, das folhas, foram avaliadas aos sete e quatorze dias após as pulverizações. Também foi determinada a produtividade. Ammonium glufosinate, nicosulfuron e atrazine + nicosulfuron reduziram a atividade da CAT e da SOD e o atrazine aumentou a atividade de APX, SOD e CAT. A produção do isohíbrido foi menor com o ammonium glufosinate que com o nicosulfuron, atrazine ou na testemunha. Conclui-se que o atrazine e nicosulfuron aumentaram a atividade das enzimas antioxidantes APX, SOD e CAT dos genótipos de milho GM, sem efeito sobre a produtividade. Estes herbicidas podem ser utilizados em programas de manejo de plantas de milho GM tolerantes ao ammonium glufosinate.

Palavras-chave: *Zea mays* L., catalase, GM, peroxidase do ascorbato, superóxido dismutase.

Abstract: Rotation of herbicides reduces the selection of resistant weed biotypes, but effects of these compounds on genetically modified genotypes are poorly understood. The objective was to evaluate the activity of antioxidant enzymes dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in genetically modified maize genotypes tolerant to ammonium glufosinate after application of the herbicides atrazine, nicosulfuron and ammonium glufosinate. The herbicides were applied on GM maize, Herculex® (TC1507) and PowerCore® (MON8934 x TC1507 x NK603) and isogenic (control) genotypes. The oxidative activity of the APX, CAT and SOD enzymes of the leaves were evaluated seven and fourteen days after spraying. Productivity was also determined. Ammonium

glufosinate, nicosulfuron and atrazine + nicosulfuron reduced CAT and SOD activity and atrazine increased APX, SOD and CAT activity. The production of isogenic was lower with ammonium glufosinate than with nicosulfuron, atrazine or in the control. It was concluded that atrazine and nicosulfuron increased the activity of the antioxidant enzymes APX, SOD and CAT of GM maize genotypes, with no effect on productivity. These herbicides can be used in management programs of GM maize tolerant to ammonium glufosinate.

Keywords: *Zea mays* L., catalase, GM, Ascorbate Peroxidase, Superoxide Dismutase.

Introdução

As culturas geneticamente modificadas (GM) tolerantes a herbicidas reduziram uso de ingredientes ativos nos primeiros anos de adoção, exceto para o glyphosate (Thomson, 2018; Duke, 2018). Aplicações sem alternância de glyphosate em plantas tolerantes a esse herbicida têm selecionado plantas daninhas resistentes (Bonny, 2016; Brookes e Barfoot, 2015). Quarenta e três de plantas daninhas resistentes ao glyphosate, 39 a herbicidas auxínicos e quatro ao ammonium glufosinate foram relatadas até 2018 (Heap, 2019) em um total de 303 espécies resistentes a herbicidas, de diferentes grupos na cultura do milho (Heap, 2018). A resistência ao glyphosate está aumentando rapidamente, com novas espécies relatadas ano após ano. Em taxa atual de mais de duas espécies por ano (Duke, 2015; Duke, 2018).

Cultivares com múltiplos genes de tolerância a herbicidas visam limitar a seleção plantas daninhas resistentes à ingredientes ativos específicos. No entanto, essa especificidade pode aumentar a quantidade aplicada do herbicida e, conseqüentemente, a ocorrência de plantas daninhas resistentes ao produto (Gressel et al., 2016). Cultivares de milho, soja e algodão, com tolerância ao glyphosate e ammonium glufosinate estão disponíveis (Beckie e Hall, 2014) e, no Brasil, genótipos de milho com tolerância empilhada ao glyphosate, 2,4-D, ammonium glufosinate e haloxyfop são comercializados (MAPA, 2018).

Ammonium glufosinate é um herbicida alternativo ao glyphosate (Barnes et al., 2017) e seu uso tem aumentado em culturas transgênicas de milho e algodão resistentes. Os genes *pat* e *cp4 epsps*, dos híbridos de milho LibertLink[®] e Power Core[®], expressam as proteínas PAT e CP4 EPSPS que conferem tolerância ao ammonium glufosinate e ao

glyphosate (Braxton et al., 2017; Cerqueira et al., 2017; Krenchinski et al., 2018). O aumento das áreas de plantio desses genótipos pode facilitar o surgimento de biótipos de plantas daninhas resistentes a esses herbicidas (Jalaludin et al., 2017). O empilhamento de características de resistência e o aumento do uso de herbicidas além do glyphosate não reduzirão a pressão de seleção sobre as plantas daninhas e nem diminuirão a quantidade total de herbicidas aplicados (Schutte et al., 2017).

A rotação com herbicidas alternativos em cultivos GM tem sido recomendada visando minimizar o problema (Owen, 2016; Davis e Frisvold, 2017; Schutte et al., 2017). Uma vez que novos herbicidas dificilmente serão comercializados no futuro próximo, devido ao aumento dos custos de desenvolvimento e, ao desafio de encontrar substâncias adequadas que cumpra os padrões regulatórios de eficiência e sustentabilidade (Schutte et al., 2017). Assim, herbicidas, usualmente utilizados, em cultivos de milho não GM nas décadas de 1970 e 80, como atrazine, pendimetalina e metolachlor, tornaram-se promissoras alternativas para o controle de plantas daninhas em campos GM (Beckie e Hall, 2014). Herbicidas alternativos ao ammonium glufosinate, eficientes e com residual, aplicados em pré e pós emergência, como atrazine e nicosulfuron e que não afetem o desempenho das variedades LibertLink[®] e Power Core[®], devem ser avaliados, pois mudanças bioquímicas, fisiológicas, produtivas e enzimáticas na planta podem comprometer a eficiência dessa tecnologia.

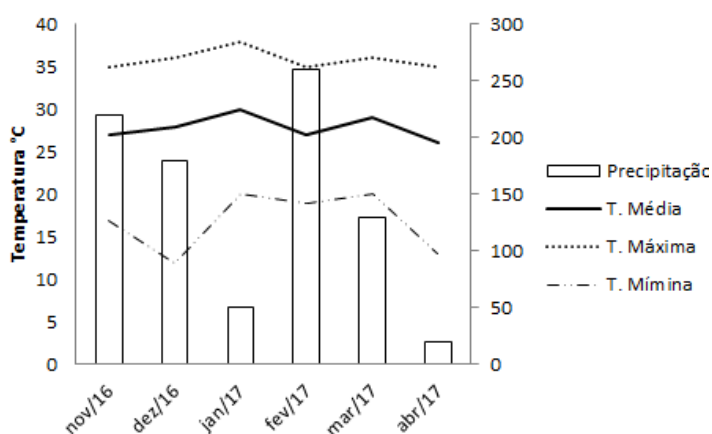
Plantas submetidas a herbicidas acumulam espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta ao estresse oxidativo por esses produtos (Jiang et al., 2016). A atividade de enzimas antioxidantes como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase do ascorbato (APX) pode indicar estresse causado por essas moléculas (Jiang e Yang, 2009; Zhang et al., 2014; Gravina et al., 2017) e, por isso, são utilizadas em estudos envolvendo a tolerância de plantas a herbicidas.

O objetivo foi avaliar a atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) de genótipos de milho GM, tolerantes ao glufosinato de amônio, após a aplicação dos herbicidas atrazine, ammonium glufosinate, nicosulfuron e nicosulfuron + atrazine.

Material e Métodos

Experimentos de campo foram montados nas safras agrícolas 2016 e 2017 no estado de Minas Gerais, Brasil. Em 2016, o experimento foi conduzido na Estação

Experimental de Rio Manso da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) (18°04'17"S 43°28'16"W e 733 m de altitude). O milho foi semeado em Latossolo Vermelho, com as seguintes características químicas: pH água (1:2,5)= 5,4; CTC pH7= 1,78 cmolc dm⁻³; M.O.= 1,78 dag dm⁻³ Ca= 1,0 cmolc dm⁻³; Mg= 0,4 cmolc dm⁻³; Al trocável= 0,1 cmolc dm⁻³; P disponível= 2,1 mg dm⁻³; K trocável= 110 mg dm⁻³; V= 42%; textura fraco arenoso, com 15% de argila, 23% de silte e 62% de areia, corrigido e adubado conforme a recomendação para a cultura (Ribeiro et al., 1999). Em 2017, o experimento foi conduzido em campo experimental do Instituto de Ciências Agrárias (ICA/UFVJM), município de Unaí-MG. (16° 21' 27" S; 46° 54' 22" O e 575 m de altitude). O plantio foi realizado em Latossolo Vermelho-Amarelo, com as seguintes características químicas: pH água (1:2,5)= 5,8; CTC pH7= 4,2 cmolc dm⁻³; M.O.= 3,1 dag dm⁻³ Ca= 2,1 cmolc dm⁻³; Mg= 1,4 cmolc dm⁻³; Al trocável= 0,0 cmolc dm⁻³; P disponível= 2,1 mg dm⁻³; K trocável= 270 mg dm⁻³; V= 54%, corrigido e adubado conforme recomendação para a cultura (Ribeiro et al., 1999). A temperatura e a precipitação foram monitoradas durante a execução do experimento (Figura 01). A produção de grãos dos genótipos de milho Herculex[®], PowerCore[®] e Isohíbrido, nas duas regiões, foi comparada entre tratamentos considerando o efeito da aplicação de herbicidas sendo obtidos valores estatisticamente semelhante para características fitotécnicas e de produtividade. Assim, o material para avaliação da atividade enzimática foi coletado apenas na safra 2017.



Fonte: INMET

Figura 01. Precipitação e temperatura entre os meses de novembro de 2016 a abril de 2017, município de Unaí-MG

Delineamento experimental

Os experimentos foram montados em blocos casualizados em esquema fatorial 5 x 3, com quatro repetições. O primeiro fator foi composto pelos herbicidas ammonium glufosinate (Finale® Bayer S.A.); atrazine (Primóleo®, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda), nicosulfuron (Sanson®, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltda) e nicosulfuron + atrazine (Sanson® + Primóleo®) e pelo controle sem aplicação de herbicida e sem capina. O segundo fator foi composto pelos genótipos de milho geneticamente modificados Herculex® (*Cry1F* + PAT) e PowerCore® (*Cry1F*, *Cry2Ab2* e *Cry1A.105*+ PAT e CP4EPPS) e um isohíbrido sem transgenes.

O solo foi arado e gradeado cinco dias antes do plantio. Cada parcela teve oito linhas com área útil de 23 m². Os genótipos de milho foram semeados em espaçamento de 0,6 m entre linhas com oito sementes/m. A irrigação foi realizada via gotejo, com turno de rega de 30 min. Em intervalos de 24 horas. Os herbicidas foram aplicados trinta dias após a semeadura, com pulverizador acionado pneumaticamente e com ar comprimido, equipado com um bocal de jato plano TT11002 calibrado para um volume de 150 L ha⁻¹, quando as plantas de milho tinham quatro folhas totalmente expandidas. As doses foram de 400 g ha⁻¹ de ammonium glufosinate, 2400 g ha⁻¹ de atrazine, 60 g ha⁻¹ de nicosulfuron e 2.400 g ha⁻¹ de atrazina + 60 g ha⁻¹ de nicosulfuron, conforme recomendação dos fabricantes (MAPA, 2018).

Atividade enzimática

A atividade das enzimas antioxidantes das folhas de milho foi avaliada aos sete e quatorze dias após a aplicação dos herbicidas. Três folhas acima da espiga, por tratamento, foram coletadas, congeladas e armazenadas em freezer. Para obtenção do extrato enzimático as plantas foram maceradas em nitrogênio líquido, meio de homogeneização composto por tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) ao mesmo (Peixoto et al., 1999). Amostras, dessa solução foram filtradas, centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto. Foram determinadas a atividade da superóxido dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1) (Bailly et al., 1996; Goel e Sheoran, 2003), catalase (CAT, E.C.1.11.1.6) (Havir e Mchale, 1989; Nakano e Asada, 1981) e Peroxidase do Ascorbado (EPX, E.C.1.11.1.11) (Nakano e Asada, 1981).

Produção de grãos

A produtividade de grãos foi determinada no estádio R6 contabilizando as plantas e espigas da parcela útil. Vinte espigas por parcela útil foram colhidas, despalhadas, secas e debulhadas. Os grãos foram pesados para estimar o rendimento [t ha⁻¹]. A produtividade foi determinada com o peso total de grãos (kg) da parcela útil (m²) transformado para área por hectare (m²). Espigas e plantas da parcela útil foram contadas e transformadas em plantas ha⁻¹.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05) com o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2014).

Resultados

A atividade das enzimas antioxidativas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) nos genótipos GM variou com os herbicidas (Tabela 1) com maior atividade com o atrazine e menor com os ammonium glufosinate, nicosulfuron e atrazine + nicosulfuron sete dias após aplicação. A atividade dessas enzimas foi normal aos 14 DAP, exceto nos genótipos expostos ao atrazine + nicosulfuron (Figura 02).

Tabela 1. Análise de variância da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em plantas de milho GM após sete (7) e quatorze (14) dias da aplicação de herbicidas

Fc							
FV	Gl	CAT7DAP	CAT14DAP	SOD7DAP	SOD14DAP	APX7DAP	APX14DAP
HB	4	28.872 ^{**}	10.984 ^{**}	38.076 ^{**}	10.769 ^{**}	208.780 ^{**}	31.618 ^{**}
GE	2	0.121 ^{ns}	2.314 ^{ns}	0.116 ^{ns}	2.965 ^{ns}	2.526 ^{ns}	11.214 ^{**}
HB*GE	8	0.107 ^{ns}	2.143 ^{ns}	0.620 ^{ns}	0.801 ^{ns}	2.727 [*]	5.774 ^{**}
Bloco	3	4.712	6.559	2.650	3.472	4.240	0.93
Erro	42	-	-	-	-	-	-
CV (%)		18.65	13.76	21.82	24.76	11.15	20.22

Ns: não significativo; **, * significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, HB- Herbicidas, GE- Genótipos, CAT7DAP-Catalase sete dias após a aplicação dos herbicidas, CAT14DAP-Catalase quatorze dias após a aplicação dos herbicidas, SOD7DAP-Superóxido dismutase sete dias após a aplicação dos herbicidas, SOD14DAP-Superóxido dismutase quatorze dias após a aplicação dos herbicidas, APX7DAP- Peroxidase do ascorbato sete dias após a aplicação dos herbicidas, APX14DAP- Peroxidase do ascorbato quatorze dias após a aplicação dos herbicidas

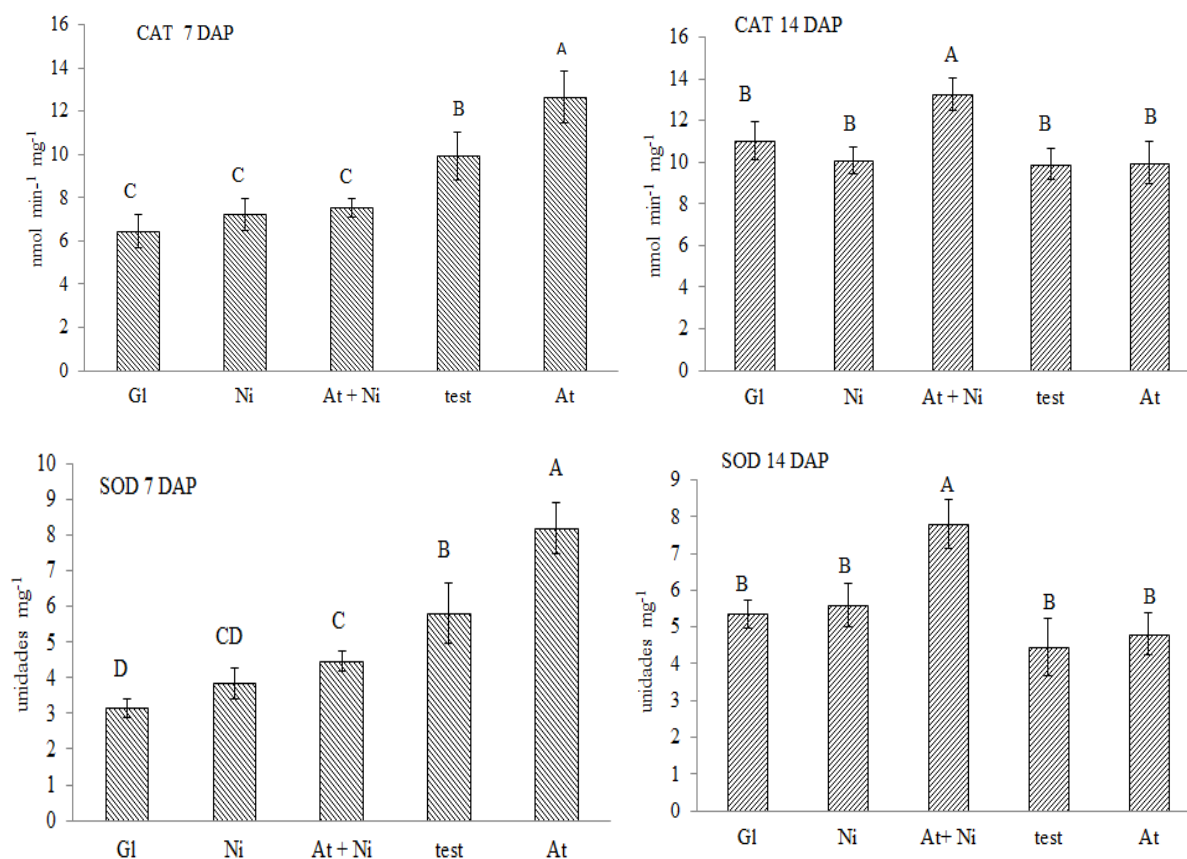


Figura 02. Atividade das enzimas catalase (CAT) ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) e superóxido dismutase (SOD) (unidades mg^{-1}) em plantas de milho GM após sete e quatorze dias da aplicação dos herbicidas atrazine (At), nicosulfuron (Ni) e ammonium glufosinate (Gl).

A atividade da enzima APX foi alterada em função dos herbicidas e do genótipo de milho. Aos sete dias após aplicação do atrazine houve aumento da APX para todos os genótipos. Os demais herbicidas promoveram diminuição na atividade da APX, comparada ao nível de atividade nas plantas sem herbicida. A menor atividade foi verificada nas plantas que receberam combinação de herbicidas atrazine e nicosulfuron (Figura 03). A atividade da APX, aos quatorze dias após a aplicação dos herbicidas nicosulfuron e atrazine + nicosulfuron, foi maior em todos os genótipos de milho com

aumentos de 103, 102 e 77% e 136, 94 e 50% para os Herculex, isohíbrido e PowerCore, respectivamente (Figura 03).

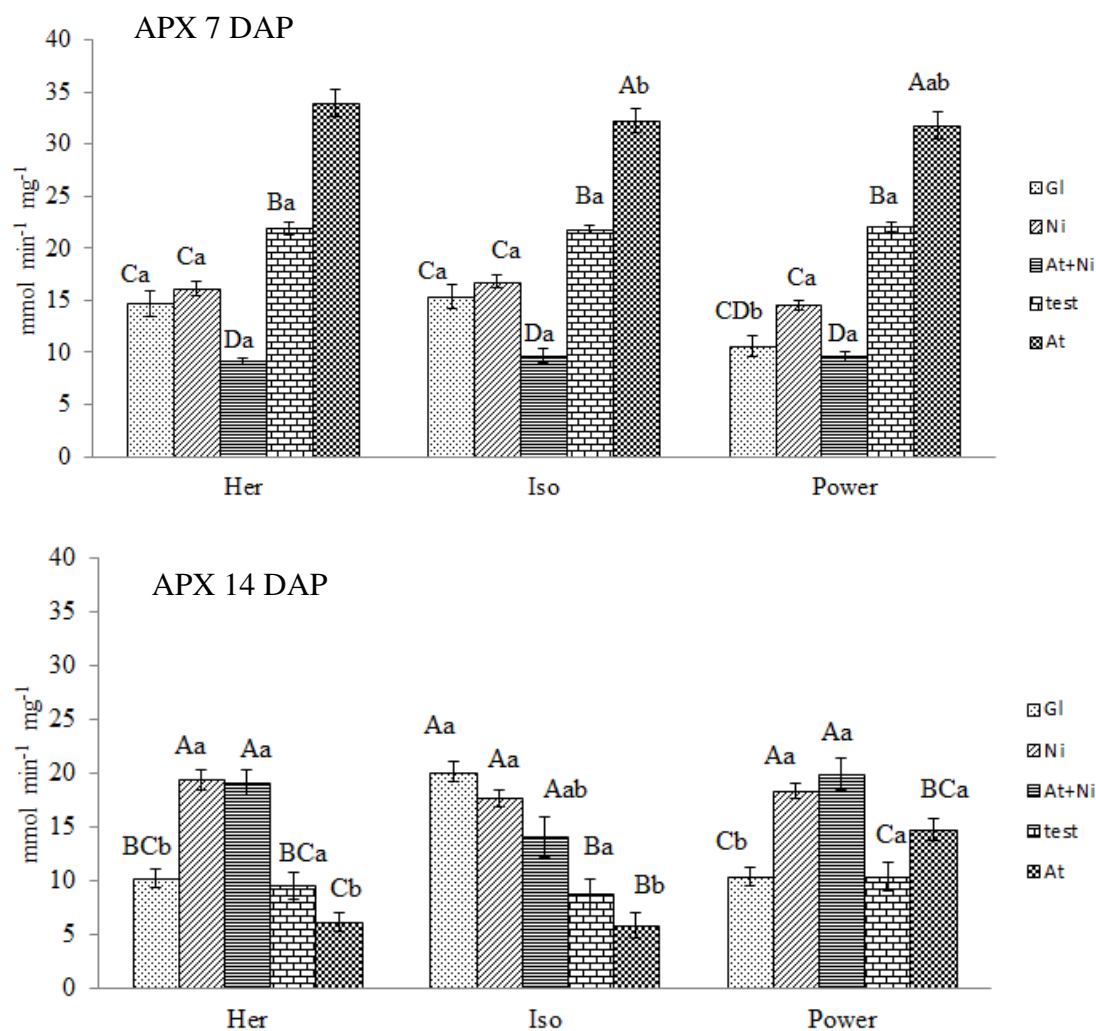


Figura 03. Atividade da enzima peroxidase do ascorbato ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) nos genótipos de milho Herculex (Her.), isohíbrido (Iso.) e PowerCore (Power) após sete e quatorze dias da aplicação dos herbicidas atrazine (At), nicosulfuron (Ni) e ammonium glufosinate (Gl). *Colunas seguidas por letras diferentes, minúsculas por genótipo e maiúscula por herbicida, diferem entre si pelo teste F e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade de erro.

A produtividade e o número de plantas e de espigas variaram entre os genótipos e herbicidas. O ammonium glufosinate afetou severamente a produtividade, número de plantas e espigas do isohíbrido chegando, 2.0 t ha^{-1} , $51,562 \text{ plantas ha}^{-1}$, $47.916 \text{ espigas ha}^{-1}$ respectivamente (Figura 04). Enquanto atrazine, nicosulfuron e atrazine + nicosulfuron apresentaram 75.173 , 71.353 e $71.353 \text{ espigas ha}^{-1}$ para o isohíbrido

respectivamente. Para os genótipos Herculex e PowerCore as produtividades dos genótipos foi de 7.76 e 8.80 t ha⁻¹ respectivamente (Figura 04). Não se observou diferença para o número de plantas entre os genótipos Herculex e Power Core, com média de 71.979 e 73.299 plantas ha⁻¹.

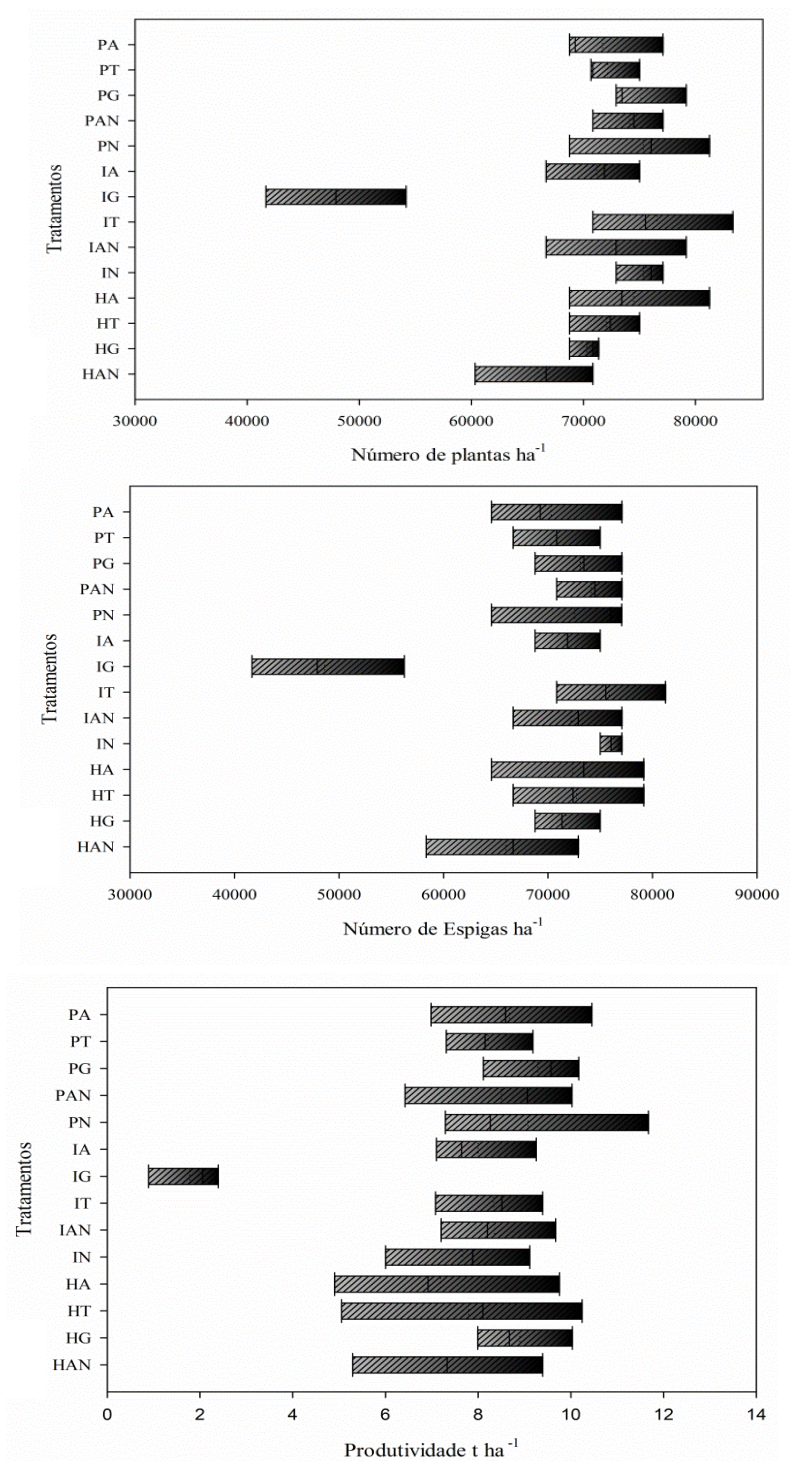


Figura 04. Número de plantas ha^{-1} , de espigas ha^{-1} e produtividade (t ha^{-1}) dos genótipos de milho Power Core, sob efeito do atrazine (PA), ammonium glufosinate (PG), nicosulfuron isolado (PN), ou em mistura ao atrazine (PAN) e testemunha (PT); isolinha, sob efeito do atrazine (IA), ammonium glufosinate (IG), nicosulfuron isolado (IN), ou em mistura ao atrazine (IAN) e testemunha (IT) e; Herculex sob efeito do atrazine (HA), ammonium glufosinate (HG), nicosulfuron isolado (HN), ou em mistura ao atrazine (HAN) e testemunha (HT).

Discussão

Sistemas de defesa de plantas contra danos oxidativos incluem enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorato peroxidase (APX) (Anjum et al., 2015). No entanto, a introdução de genes para a obtenção de plantas GM pode causar desvios nos genomas das plantas (Schouten et al., 2017) e afetar a tolerância das plantas a herbicidas. Plantas transgênicas de *Arabidopsis* tiveram a atividade da SOD aumentada comparadas com plantas silvestres (Kaothar et al., 2016). A análise preliminar dos resultados comprovou comportamento semelhante de produção em ambas safras 2016 e 2017, portanto, as médias serão apresentadas relacionando atividade enzimática após aplicação dos herbicidas somente para a segunda safra.

A maior atividade das enzimas SOD e CAT aos sete dias após a aplicação do herbicida atrazine é causado pelo aumento da produção e acúmulo de H_2O_2 promovido pelo herbicida (Alla e Hassan, 2006; Ramel et al., 2009). Aumento no teor de SOD e CAT indica estresse oxidativo provocado pelo atrazine (Zhang et al., 2017), e tentativa da planta em se recuperar dos danos induzidos pela aplicação do herbicida na célula, com aumento na produção dos ROS (Rutherford e Krieger-Liszky, 2001). O atrazine inibe a fotossíntese por se ligar competitivamente ao sítio de ligação da plastoquinona B (QB) da subunidade D1 do PSII, bloqueando o fluxo de elétrons dos cloroplastos da plastoquinona A para QB, reduzindo a produção de ATP, NADPH e fixação de CO_2 (Chen et al., 2014). O bloqueio no fluxo de elétrons contribui para a formação do oxigênio singlet responsável pela peroxidação lipídica decorrente da ação do herbicida (Erinle et al., 2016). E como consequências aumento da ROS que envolvem danos oxidativos às membranas, proteínas, RNA e DNA e destruição oxidativa da célula (Choudhury et al., 2016; Sofu et al., 2015; Luo et al., 2017). As ROS geradas pelo mecanismo de ação da atrazine, como descrito

acima, provocaram desequilíbrios redox e alterações na regulação gênica e síntese protéica e, portanto, uma diminuição geral da atividade celular (Esperanza, et al., 2017; Zhang et al., 2014; Noctor et al., 2015; Esperanza, et al., 2017). Exposição de folhas de arroz ao atrazine aumentou a atividade da SOD em 118-525% e CAT em 189-369% devido ao excesso de H_2O_2 gerado pelo herbicida (Zang et al., 2014) causando a ativação de enzimas antioxidantes que podem converter moléculas tóxicas, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^\cdot) e superóxido (O_2^\cdot), em água e oxigênio (Zang et al., 2014; Wang et al., 2017).

A regularização na atividade de SOD e CAT aos quatorze dias sob efeito do ammonium glufosinate, nicosulfuron e atrazine evidencia a tolerância dos genótipos aos herbicidas testados. A redução na atividade da SOD e CAT com ammonium glufosinate, nicosulfuron e atrazine + nicosulfuron pode indicar que até sétimo o herbicida ainda não havia sido metabolizado pela planta. Portanto, a regularização da atividade das enzimas aos 14 DAP demonstra que os transgenes não afetaram a tolerância dos genótipos aos herbicidas avaliados. Aplicação de atrazine levaram a um aumento na peroxidação lipídica foliar, decréscimo na assimilação líquida de CO_2 e rendimento quântico máximo de PSII. Esses efeitos são considerados transitórios, devido à habilidade das plantas de milho em desintoxicar o herbicida e induzir uma resposta antioxidante eficaz (Oliveira et al., 2015). E normalizando atividade das enzimas aos 14 dias.

Maior atividade da enzima APX nos genótipos expostos aos herbicidas atrazine aos 7 DAP e nicosulfuron e atrazine + nicosulfuron aos 14 DAP demonstra reação da planta em recuperar do estresse oxidativo (Zhang et al., 2016; Erinle et al., 2018; Wang et al., 2018a) e sua tolerância ao atrazine e nicosulfuron (Erinle et al., 2016; Wang et al., 2018a). O peróxido de hidrogênio é catalisado pela enzima APX por meio do ciclo de eliminação pela glutatona ascorbato (Jiang et al., 2016). A via ascorbato-glutationa (Asa-GSH) desempenha papel central no combate aos ROS, e engloba muitas enzimas antioxidantes como CAT, APX e glutatona-S-transferase (GST), sendo responsáveis também pela tolerância do milho ao atrazine (Bela et al., 2015; Gill, et al., 2013; Zhang et al., 2014). Portanto, aumento da atividade dessas enzimas nesse trabalho indica tentativa da planta em recuperar da exposição ao atrazine mesmo em plantas tolerantes. Sendo que o atrazine também pode causar estresse oxidativo em plantas tolerantes (Jiang et al., 2016).

O nicosulfuron inibe a enzima acetolactato sintase (ALS) em plantas e interrompe a biossíntese de aminoácidos ramificados de cadeias longas isoleucina, leucina

e valina (Leite et al., 2017). Outros efeitos indiretos desse herbicida incluem acúmulo excessivo de energia de excitação no centro de reação PSII comprometendo a estabilidade da proteína D1 da plastoquinona A (QA). A consequência é a desativação reversível ou destruição do centro de reação PSII, afetando a oxigênio fotossintético e a eficiência no transporte de elétrons (Yuan et al., 2014), consequentemente aumentando a ROS e induzindo aumento na atividade da APX. O aumento dos ROS, em ambos os herbicidas, pode ser evidenciado pelo aumento na atividade das enzimas APX. Aumento da atividade da enzima APX pelo nicosulfuron tem sido associado ao acúmulo de O_2^- e H_2O_2 com redução do transporte de elétrons, gerando O^- (Wang et al., 2018b). O aumento do teor de H_2O_2 nos genótipos de milho SN509-S com o tempo de exposição ao herbicida se deve à sensibilidade e a incapacidade da planta em degradar o herbicida de forma rápida. A tolerância do milho ao nicosulfuron foi avaliada (Sprague et al, 1999) sendo diferente entre genótipos e menor naqueles com maior tempo de degradação da molécula.

O resíduo do herbicida no interior da planta é responsável pelo aumento dos ROS e por consequência aumento na atividade das enzimas antioxidantes (Wang et al., 2018a). Plantas tolerantes podem degradar o nicosulfuron por meio da atividade das monoxigenases CYP450, levando a redução do herbicida. A seletividade diferencial em plantas sob efeito do nicosulfuron baseia-se nas diferentes taxas de metabolização, velocidade de absorção e translocação na planta. Que dependem do estágio de desenvolvimento da cultura (Cavaliere et al., 2008). No entanto, o tempo de degradação lento do herbicida na planta, e o nicosulfuron residual na planta pode contribuir para aumento dos ROS (Wang et al., 2018c). O H_2O_2 pode ser efetivamente desintoxicado nos cloroplastos e em outras organelas, nos quais o APX é uma enzima chave da via ascorbato-glutationa (AA-GSH) envolvida na transformação de H_2O_2 em H_2O que utiliza o ascorbato como doador de elétrons (Wang et al., 2018a).

Alteração da atividade enzimática para compostos antioxidantes em plantas de milho transgênico, tratada com diferentes herbicidas, pode demonstrar a fragilidade na adoção dos cultivos GM, caso a tecnologia não seja usada dentro dos padrões recomendados de aplicação. Isso pode ser traduzido na prática pela recorrente seleção de plantas daninhas após repetidas aplicações dos mesmos herbicidas, visando maior lucratividade com os novos genótipos. Com a multiplicação de biótipos resistentes a glyphosate ou ammonium glufosinate, alternativas de controle químico de plantas nos

genótipos PowerCore e Herculex seriam atrazine e nicosulfuron, dessa forma, com possível alteração das enzimas SOD, CAT e APX.

A menor produtividade do isohíbrido com o ammonium glufosinate mostra sensibilidade dessas plantas a essa molécula pelo acúmulo de amônio causada pela inibição da glutamina sintetase (GS) (Carbonari et al., 2016), enzima chave responsável pela assimilação da amônia (Fernández et al., 2016) responsável pela conversão da amônia em glutamina. A inibição da GS pelo herbicida, inibe a síntese de aminoácido importante na formação proteica e inibe, indiretamente a fotossíntese, causando necrose do tecido foliar e morte da planta (Jalaludin et al., 2017; Salas-Perez et al., 2018). Dessa forma, a redução da produtividade, número de plantas e número de espigas no isohíbrido era esperado em virtude da sensibilidade do genótipo ao herbicida ammonium glufosinate. Já produtividade dos genótipos Herculex e PowerCore com os herbicidas atrazine, nicosulfuron e ammonium glufosinate confirma a tolerância dessas plantas a esses herbicidas devido às enzimas glutathione-S-transferase (GST) para atrazine (Li et al., 2017; Yuan et al., 2007), a ação conjunta de várias enzimas pertencentes ao complexo citocromo P450s, carboxilesterases, glutathione e glicosiltransferases para nicosulfuron (Riechrs et al., 2010) e pelos genes PAT conferindo tolerância ao ammonium glufosinate nos genótipos de milho GM (Salas-Perez et al., 2018). A introdução de genes de resistência a outros herbicidas como glyphosate e ammonium glufosinate não reduziu a tolerância de plantas de milho ao atrazine como relatado para aquelas resistentes ao glyphosate e que continuaram tolerantes a esse herbicida e ao nicosulfuron (Correia et al., 2013; Albrecht et al., 2017; Krenchinski et al., 2018).

As alterações da atividade das enzimas antioxidantes não provocaram alterações na tolerância dos genótipos de milho GM aos herbicidas atrazine, nicosulfuron e nicosulfuron + atrazine observadas através da produtividade dos genótipos. Nesse aspecto, é importante ressaltar a viabilidade desses herbicidas em programas de manejo de plantas daninhas em áreas infestadas por plantas daninhas resistentes aos herbicidas ammonium glufosinate e glyphosate. Entretanto, muitos outros aspectos podem afetar a tolerância dos genótipos, sejam fatores abióticos e bióticos, dentre os quais, fatores ambientais, pragas e doenças podem reduzir a tolerância desses genótipos. Todavia, esses genótipos apresentam-se como ótimas opções de cultivos, e os herbicidas atrazine e nicosulfuron eficientemente podem ser adotados como alternativas no manejo integrado de plantas daninhas, assegurando controle eficiente sem prejuízos produtivos aos genótipos.

O atrazine aumentou a atividade das enzimas CAT, SOD e o nicosulfuron a da enzima APX em genótipos GM de milho, mas não reduziu a produção dos mesmos. O herbicida ammonium glufosinate não provocou estresse oxidativo nos genótipos de milho GM. Esses herbicidas podem ser recomendados para programas de manejo de plantas daninhas em cultivos de plantas de milho GM resistentes ao glufosinato de amônio.

Referências

Albrecht, A.J.P., Albrecht, L.P., Krenchinski, F.H., Wobeto, K.S., Mattiuzzi, M.D., Eckert, C.T., Carbonari, C.A., Filho, R.V. 2017. Assessment of Roundup Ready 2 (RR2) corn subjected to application of isolated and associated herbicides. *Australian Journal of Crop Science* 11(8): 974-981.

Alla, M.M.N., Hassan, N.M. 2006. Changes of Antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. *Plant Physiology and biochemistry* 44(4): 202-10.

Anjum, S.A., Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L., Khan, I., Ullah, E., Tung, S.A., Samad, R.A., Shahzad, B. 2015. Cadmium toxicity in maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. *Environmental Science and Pollution Research* 22(21): 17022-17030.

Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., Come, D. 1996. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum* 97(1): 104-110.

Barnes, E.R., Knezevic, S.Z., Sikkema, P.H., Linquist, J.L., Jhala, A.J. 2017. Control of glyphosate-resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in glufosinate-resistant soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-10.

Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., Csiszár, J. 2015. Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* 176: 192-201.

Beckie, H.J., Hall, L.M. 2014. Genetically-modified herbicide-resistant (GMHR) crops a two-edged sword? An Americas perspective on development and effect on weed management. *Crop Protection* 66: 40-45.

Bonny, S. 2016. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: overview and impact. *Environmental Management* 57(1): 31-48.

Braxton, L.B., Richburg, J.S., York, A.C., Culpeper, A.S., Haygood, R.A., Lovelace, M.L., Perry, D.H., Walton, L.C. 2017. Resistance of Enlist™ (AAD-12) cotton to glufosinate. *Weed Technology* 31(3): 380-386.

Brookes, G., Barfoot, P. 2015. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2013: impacts on pesticide use and carbon emissions. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 6(2): 103-133.

Carbonari, C.A., Latorre, D.O., Gomes, G.L.G.C., Velini, E.D., Owens, D.K., Pan, Z., Dayan, F.E. 2016. Resistance to glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in LibertyLink® and WideStrike® cotton. *Planta* 243(4): 925-933.

Cavaliere, S.D., Oliveira Junior, R.S., Constantin, J., Biffe, D.F., Rios, F.A., Franchini, L.H.M. 2008. Tolerância de híbridos de milho ao nicossulfuron. *Planta Daninha* 26(1): 203-14.

Cerqueira, D.T.R., Schafer, A.C., Rápido, B.J., Herman, R.A. 2017. Agronomic performance of insect-protected and herbicide-tolerant MON 89034 × TC1507 × NK603 × DAS-40278-9 corn is equivalent to that of conventional corn. *Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 8(3): 149-155.

Chen, L., Zhu, X., Wang, Y., Chen, L., Duan, Y. 2014. Proteomic analysis of the bacterial induction of resistance to atrazine in soybean leaves. *Acta Physiologiae Plantarum* 36(8): 2229-2241.

Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E., Mittler, R. 2016. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* 90(5): 856-867.

Correia, N.M., Santos, E.A. 2013. Teores foliares de macro e micronutrientes em milho tolerante ao glyphosate submetido à herbicidas. *Semina* 34(6): 3165-3172.

Davis, A.S., Frisvold, G.B. 2017. Are herbicides a once in a century method of weed control? *Pest Management Science* 73(11): 2209-2220.

Duke, S.O. 2015. Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the United States almost 20 years after introduction. *Pest Management Science* 71(5): 652-657.

Duke, S.O. 2018. The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science* 74(5): 1027-1034.

Erinle, K.O., Jiang, Z., Li, M., Su, G., Ma, B., Ma, Y., Zhang, Y. 2016. Oxidative stress response induced in an atrazine phytoremediating plant: Physiological responses of *Pennisetum glaucum* to high atrazine concentrations. *International Journal of Phytoremediation* 18(12): 1187-1194.

Erinle, K.O., Jiang, Z., Ma, B., Ur-Rehman, K., Shahla, A., Zhang, Y. 2018. Physiological and molecular responses of pearl millet seedling to atrazine stress. *International Journal of Phytoremediation* 20(4): 343-351.

Esperanza, M., Houde, M., Seoane, M., Cid, Á., Rioboo, C. 2017. Does a short-term exposure to atrazine provoke cellular senescence in *Chlamydomonas reinhardtii*? *Aquatic Toxicology* 189: 184-193.

Fernández, P., Alcántara, R., Osuna, M.D., Vila-Aiub, M.M., Padro, R. 2016. Forward selection for multiple resistance across the non-selective glyphosate, glufosinate and oxyfluorfen herbicides in *Lolium* weed species. *Pest Management Science* 73(5): 936-944.

Ferreira, D.F. 2014. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência Agrotécnica* 38(2): 109-112.

Gill, S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E., Tuteja, N. 2013. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 204-212.

Gravina, F., Dobrzanski, T., Olchanheski, L.R., Galvão, C.W., Reche, P.M., Pileggi, S.A., Azevedo, R.A., Sadowsky, M.J., Pileggi, M. 2017. Metabolic interference of sod gene mutations on catalase activity in *Escherichia coli* exposed to Gramoxone® (paraquat) herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139: 89-96.

Gresssel, R., Gassmann, A.J., Owen, M.D.K. 2016. How well will stacked transgenic pest/herbicide resistances delay pests from evolving resistance? *Pest Management Science* 73(1): 22-34.

Goel, A., Sheoran., S.I. 2003. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. *Biologia Plantarum* 46(3): 429-434.

Havir, E., Mchale, N. A. 1989. A regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO₂. *Plant Physiology* 89(3): 952-957.

Heap, I. 2018. The international survey of herbicide resistant weeds, Online. Disponível em: <http://www.weedscience.com/Summary/MOA.aspx>. Acesso em: 23 outubro de 2018.

Heap, I. 2019. The international survey of herbicide resistant weeds, Online. Disponível em: <http://www.weedscience.com/Summary/MOA.aspx>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2019.

Jalaludin, A., Yu, Q., Zoellner, P., Beffa, R., Powles, S.B. 2017. Characterisation of glufosinate resistance mechanisms in *Eleusine indica*. *Pest Management Science* 73(6): 1091-1100.

Jiang, L., Yang, H. 2009. Prometryone-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in wheat. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(6): 1687-1693.

Jiang, Z., Ma, B., Erinle, K.O., Cao, B., Liu, X., Ye, S., Zhang, Y. 2016. Enzymatic antioxidant defense in resistant plant: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum during long-term atrazine exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 133: 59-66.

Kaouthar, F., Ameny, F., Yosra, K., Walid, S., Ali, G., Faiçal, B. 2016. Responses of transgenic *Arabidopsis* plants and recombinant yeast cells expressing a novel durum wheat manganese superoxide dismutase TdMnSOD to various abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology* 198: 56-68.

Krenchinski, F.H., Albrecht, A.J.P., Cesco, V.J.S., Rodrigues, D.M., Pereira, V.G.C., Albrecht, L.P., Carbonari, C.A.; Filho, R.V. 2018. Post-emergent applications of isolated and combined herbicides on corn culture with cp4-epsps and pat genes. *Crop Protection* 106: 156-162.

Leite, G.L.D., Paulo, P.D., Zanuncio, J.C., Tavares, W.S., Alvarenga, A.C., Dourado, L.R., Bispo, E.P.R., Soares, M.A. 2017. Nicosulfuron plus atrazine herbicides and trichogrammatidae (Hymenoptera) in No-Choice test: selectivity and Hormesis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 99(5): 589-594.

Li, D., Gao, Q., Xu, L., Pang, S., Liu, Z., Wang, C., Tan, W. 2017. Characterization of glutathione S-transferases in the detoxification of metolachlor in two maize cultivars of differing herbicide tolerance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 143: 265-271.

Luo, X., Liu, Z., Sunohara, Y., Matsumoto, H., Li, P. 2017. Involvement of H₂O₂ in fluazifop-P-butyl-induced cell death in bristly starbur seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 143: 258-264.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA- Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - Agrofit. 2018. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: abril de 2018.

Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiology* 22(5): 867-880.

Nemat Alla, M.M., Hassan, N.M. 2006. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. *Plant Physiology and Biochemistry* 44(4): 202-210.

Noctor, G., Lelarge-Trôvarie, C., Mhamdi, A. 2015. The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry* 112: 33-53.

Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., Martinez, C.B., Souza, G.F., Grillo, R., Jesus, M.B., Fraceto, L.F. 2015. Evaluation of the side effects of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing atrazine toward maize plants. *Frontiers in Chemistry* 3:61.

Owen, M.D.K. 2016. Diverse approaches to herbicide-resistant weed management. *Weed Science* 64(1): 570-584.

Peixo, P.H.P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquin, P.R., Moreira, M.A. 1999. Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11(3): 137-143.

Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., Couée, I., Gouesbet, G. 2009. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology* 9: 28.

Ribeiro, A.C., Guimarães, P.T.G., Alvarez, V.H. 1999. Comissão de Fertilidade do Solo dos Estado de Minas Gerais Romendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais, 5º Aproximação - Viçosa, MG. 359p.

Riechers, D.E., Kreuz, K., Zhang, Q. 2010. Detoxification without intoxication: herbicide safeners activate plant defense gene expression. *Plant Physiology* 153(1): 3-13.

Rutherford, A.W., Krieger-Liszkay, A. 2001. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends in Biochemical Sciences* 26(11): 648-53.

Salas-Perez, R.A., Saski, C.A., Noorai, R.E., Srivastava, S.K., Lawton-Rauh, A.L., Nichols, R.L., Roma-Burgos, N. 2018. RNA-Seq transcriptome analysis of *Amaranthus palmeri* with differential tolerance to glufosinate herbicide. *PLoS ONE* 13(4): e0195488.

Schouten, H.J., Geest, H., Vande Papadimitriou, S., Bemer, M., Schaart, J.G., Smulders, M.J.M., Perez, G.S., Schijlen, E. 2017. Re-sequencing transgenic plants revealed rearrangements at T-DNA inserts, and integration of a short T-DNA fragment, but no increase of small mutations elsewhere. *Plant Cell Reports* 36(3): 493-504.

Schutte, G., Eckerstorfer, M., Rastelli, V., Reichenbecher, W., Restrepo-Vassalli, S., Ruonhonen-Lehto, M., Saucy, A.G.W., Mertens, M. 2017. Herbicide resistance and biodiversity: ahronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environmental Sciences Europe* 29(5): 1-12.

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., Vitti, A. 2015. Ascorbate peroxidase and catalase and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 13561-13578.

Sprague, L.C., Penner, D., Kells, J.J. 1999. Physiological basis for tolerance of four *Zea mays* hybrids to RPA 201772. *Weed Science* 47(6): 631-635.

Thomson, J.A. 2018. The pros and cons of GM crops. *Functional Plant Biology* 45(3): 297-304.

Yuan, J., Tranel, P.J., Stewart Jr. C.N. 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12(1): 6-13.

Yuan, X., Zhang, L., Ning, N., Wen, Y., Dong, S., Yin, M., Guo, M., Wang, B., Feng, L., Guo, P. 2014. Photosynthetic physiological response of radix isatidis (*Isatis indigotica* Fort.) seedlings to nicosulfuron. PLoS ONE 9(8): e105310.

Wang, D.F., Pang, X.J., Yang, F., Kou, L.S., Zhang, X., Yu, P.X., Niu, Y.B. 2017. Antioxidative enzymes, calcium, and ABA signaling pathway are required for the stress tolerance of transgenic wheat plant by the ectopic expression of harpin protein fragment Hpa1₁₀₋₄₂ under heat stress. Russian Journal Plant Physiology 64(6): 899-905.

Wang, J., Zhong, X., Li, F., Shi, Z. 2018a. Effects of nicosulfuron on growth, oxidative damage, and the ascorbate-glutathione pathway in paired nearly isogenic lines of waxy maize (*Zea mays* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology 145: 108-117.

Wang, J., Zhong, X., Zhu, K., Lv, J., Lv, X., Li, F., Shi, Z. 2018b. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activity, and gene expression patterns in a pair of nearly isogenic lines of nicosulfuron-exposed waxy maize (*Zea mays* L.). Environmental Science and Pollution Research 25(245): 1-16.

Wang, X., Wu, L., Xie, J., Li, T., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., Jiang, D. 2018c. Herbicide isoproturon aggravates the damage of low temperature stress and exogenous ascorbic acid alleviates the combined stress in wheat seedlings. Plant Growth Regulation 84(2): 293-301.

Zhang, J.J., Lu, Y.C., Zhang, S.H., Lu, F.F., Yang, H. 2016. Identification of transcriptome involved in atrazine detoxification and degradation in alfalfa (*Medicago sativa*) exposed to realistic environmental contamination. Ecotoxicology and Environmental Safety 130: 103-112.

Zhang, J.J., Lu, Y.C., Zhang, J.J., Tan, L.R., Yang, H. 2014. Accumulation and toxicological response of atrazine in rice crops. Ecotoxicology and Environmental Safety 102: 105-112.

Zhang, J.J., Xu, J.Y., Lu, F.F., Jin, E.F., Yang, H. 2017. Detoxication of atrazine by molecular weight thiols in alfalfa (*Medicago sativa*). Chemical Research in Toxicology 30(10): 1835-1846.

ARTIGO CIENTÍFICO III

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE GRÃOS DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO SOB EFEITO DA APLICAÇÃO DE HERBICIDAS

Resumo: As culturas geneticamente modificadas (GM) têm contribuído significativamente para o crescimento da agricultura nos últimos anos. No entanto, o uso irresponsável de herbicidas em culturas GM contribuiu para a seleção de plantas daninhas resistentes. Herbicidas como glyphosate têm despontado como o principal responsável pela seleção de plantas resistentes. Para tanto, opções de manejo de plantas daninhas em culturas GM estão em estudos, objetivando reduzir a pressão dessas moléculas sobre as plantas daninhas. Com isso, objetivou-se nesse estudo, estudar o efeito da aplicação dos herbicidas atrazine e nicosulfuron sobre a composição química dos genótipos de milho Power Core e Herculex. E avaliar a segurança da aplicação dos herbicidas atrazine e nicosulfuron, sobre os genótipos de milho GM, Herculex[®] e PowerCore[®]. Os genótipos foram submetidos ao efeito da aplicação dos herbicidas atrazine, nicosulfuron e ammonium glufosinate. Após a aplicação dos herbicidas, foram avaliadas a composição química dos grãos através da composição centesimal, compostos fenólicos e antocianinas. Os herbicidas não alteraram a composição química dos grãos entre os genótipos. Os valores de umidade média percentual foi 10,28%, lipídios 6,77%, proteínas 10,56%, fibra bruta 3,86%, cinzas 1,89% e carboidratos 66,62%. Os herbicidas atrazine e nicosulfuron são opções em programa de manejo de plantas daninhas de difícil controle nos genótipos de milho GM Herculex[®] e PowerCore[®].

Palavras-Chave: *Zea mays* L., Herculex, PowerCore, Atrazine e Nicosulfuron.

Abstract: Genetically modified (GM) crops have contributed significantly to the growth of agriculture in recent years. However, the irresponsible use of herbicides in GM crops contributed to the selection of resistant weeds. Herbicides like glyphosate have emerged as the main responsible for the selection of resistant plants. Therefore, weed management options in GM crops are in studies, aiming to reduce the pressure of these molecules on weeds. The objective of this study was to study the effect of herbicides atrazine and nicosulfuron on the chemical composition of the maize genotypes Power Core and Herculex. And to evaluate the safety of herbicides atrazine and nicosulfuron, on GM, Herculex[®] and PowerCore[®] maize genotypes. The genotypes were submitted to the application of herbicides atrazine, nicosulfuron and ammonium glufosinate. After

application of the herbicides, the chemical composition of the grains was evaluated through the centesimal composition, phenolic compounds and anthocyanins. The herbicides did not alter the chemical composition of the grains among the genotypes. The mean percentage moisture content was 10.28%, lipids 6.77%, proteins 10.56%, crude fiber 3.86%, ashes 1.89% and carbohydrates 66.62%. The herbicides atrazine and nicosulfuron are difficult-to-control weed management programs in GM maize genotypes Herculex® and PowerCore®.

Keywords: *Zea mays* L., Herculex, PowerCore, Atrazine and Nicosulfuron.

Introdução

A expressão das enzimas fosfinotricina acetiltransferase (PAT) e 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintase (2mEPSPS) inativa ação herbicídica das moléculas ammonium glufosinate e glyphosate, respectivamente (Herman et al., 2018). Novos eventos geneticamente modificados com essas enzimas estão sendo comercializados no Brasil (MAPA, 2018). A integração transgenes no genoma das plantas podem causar alterações não intencionais por deleções, inserções ou rearranjos, que são responsáveis pelos efeitos pleiotrópicos (Gayen et al., 2016). Essas alterações podem afetar o metabolismo de proteínas causando alterações negativas em plantas ou na segurança dos alimentos para alimentação humana, podendo alterar a composição dos grãos (Cutulle et al., 2018). Estratégias de avaliação da segurança desses alimentos GM denominadas de “equivalência substancial”, mede se o alimento biotecnológico compartilha as mesmas características sanitárias e nutricionais similares com sua contraparte convencional (Gayen et al., 2016; Mesnage et al., 2016; Vidal et al., 2015). Na análise de equivalência substancial, medições de analitos representando nutrientes essenciais, antinutrientes, substâncias tóxicas e metabólitos secundários de culturas GM são comparados com dados coletados de plantas não GM (Cong et al., 2015). Sendo importante para eventual comercialização de culturas transgênicas (Gayen et al., 2016). A maioria destes estudos demonstraram que as culturas geneticamente modificadas (GM) são essencialmente as mesmas que as não-transgênicas (Tang et al., 2017). Sobre riscos alimentares, as proteínas PAT e 2mEPSPS não representam riscos (Herman et al., 2018). Porém, poucos estudos

avaliaram a sensibilidade de novos genótipos GM com essas proteínas com outros herbicidas.

A seleção de plantas daninhas resistente ao glyphosate com a introdução de culturas resistentes é reflexo do uso insustentável (Green, 2018; Schütte et al., 2017). A repetição de culturas tolerantes ao glyphosate e aplicação nos mesmos campos, sem alternância e diversidades de herbicidas suficientes têm colocado em risco a tecnologia (Bonny, 2016). Em razão disto, a adoção de culturas resistente ao ammonium glufosinate tem crescido (Gaines, 2018; Schütte et al., 2017). No entanto, o ammonium glufosinate geralmente tem um custo mais alto e um controle menos consistente que o glyphosate (Gaines, 2018). Além disso, o aumento das áreas de plantio dessas variedades tolerantes ao ammonium glufosinate pode facilitar o surgimento de biótipos de plantas daninhas resistentes também a esse herbicida (Jalaludin et al., 2017). Diante disso, cultivos resistentes a herbicidas alternativos ou programas com moléculas diversificados são necessários para gerenciar plantas daninhas resistentes a esses produtos (Aulakh e Jhala, 2015). Herbicidas do grupo das triazinas e inibidores da acetolactato sintetase estão sendo utilizados em programas de manejo da soja resistente ao glyphosate (Aulakh e Jhala, 2015).

O herbicida atrazine (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é bastante utilizado para o controle de plantas daninhas de folhas largas e gramíneas em cultivos de milho (Hou et al., 2017; Ji et al., 2015; Kong et al., 2016). Apresenta moderada solubilidade aquosa e alta persistência em água com meia vida de cerca de 100 dias (Hou et al., 2017). Apesar de relatos envolvendo a contaminação de cursos d'água pelo herbicida (Kong et al., 2016). O herbicida é uma alternativa para o controle de plantas daninhas resistentes em culturas GM, como o milho, apresentando excelente controle das plantas daninhas. É considerado eficaz, barato com efeito residual no solo, que previne a emergência de ervas daninhas por um longo período após a aplicação (Beckie e Hall, 2014; Dong et al., 2017; Hou et al., 2017).

E é o segundo herbicida mais utilizado em cultivo de milho nos Estados Unidos (Dong et al., 2017). Já o nicosulfuron [2 - [(4,6-dimetoxipirimidina-2-ilcarbamoil) sulfamoil] - *N, N*- dimetilnicotinamida] herbicida sulfoniluréia que fornece controle pós-emergência de plantas daninhas de folhas largas em milho (Sun et al., 2017). Aplicado em baixas doses e apresenta média persistência no solo (Ahmadi et al., 2017). A eficácia do nicosulfuron compensa devido à escassez de herbicidas pós-emergentes no milho (Wang et

al., 2018). Diante do cenário para os próximos anos com os cultivos GM tolerante a herbicidas. Os herbicidas, atrazine e nicosulfuron podem ser uma opção de manejo para essas culturas, no entanto, poucas informações sobre a tolerância desses genótipos aos herbicidas foram relatadas.

Dessa forma, objetivou-se com essa pesquisa, estudar o efeito da aplicação dos herbicidas atrazine e nicosulfuron sobre a composição química dos genótipos de milho Power Core e Herculex.

Material e Métodos

Experimentos de campo foram montados nas safras agrícolas 2016 e 2017 no estado de Minas Gerais, Brasil. Em 2016, o experimento foi conduzido na Estação Experimental de Rio Manso da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) (18°04'17"S 43°28'16"W e 733 m de altitude). Em 2017, o experimento foi conduzido na Estação Experimental de Unaí do Instituto de Ciências Agrárias (ICA/UFVJM) (16° 21' 27" S; 46° 54' 22" O e 575 m de altitude).

Os experimentos foram montados em blocos casualizados em esquema fatorial 5 x 3 com quatro repetições. O primeiro fator foi composto pelos herbicidas ammonium glufosinate (Finale® Bayer S.A.); atrazine (Primóleo®, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda), nicosulfuron (Sanson®, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltda) e nicosulfuron + atrazine (Sanson® + Primóleo®) e pelo controle sem aplicação de herbicida e sem capina. O segundo fator foi composto pelos genótipos de milho geneticamente modificados Herculex® (*Cry1F* + PAT) e PowerCore® (*Cry1F*, *Cry2Ab2* e *Cry1A.105*+ PAT e CP4EPSPS) e um isohíbrido sem transgenes.

As sementes foram semeadas cinco dias após a aração e gradagem do solo. Cada parcela teve oito linhas com área útil de 23 m². Os genótipos de milho foram semeados em espaçamento de 0,6m entre linhas com oito sementes/m. A irrigação foi realizada via gotejo, com turno de rega de 30 min. Em intervalos de 24 horas. Os herbicidas foram aplicados trinta dias após a semeadura, com pulverizador acionado pneumaticamente e com ar comprimido, equipado com um bocal de jato plano TT11002 calibrado para um volume de 150 L ha⁻¹, quando as plantas de milho tinham quatro folhas totalmente expandidas. As doses foram de 400 g ha⁻¹ de ammonium glufosinate, 2400 g ha⁻¹

¹ de atrazina, 60 g ha⁻¹ de nicosulfuron e 2400 g ha⁻¹ de atrazina + 60 g ha⁻¹ de nicosulfuron, conforme recomendação dos fabricantes (MAPA, 2018).

Foram realizadas todas as etapas de manejo da cultura e, quando os grãos atingiram a maturidade fisiológica as espigas foram colhidas e encaminhadas para secagem e trilha. Os grãos de milho seco foram debulhados e peneirados para remoção dos grãos pequenos e quebrados. Para determinação da produção de grãos, as espigas foram colhidas no estádio R6, os grãos foram pesados para estimar a produção [kg ha⁻¹]. A produção de grãos dos genótipos de milho Herculex[®], PowerCore[®] e Isohíbrido, nas duas regiões, foi comparada entre tratamentos considerando o efeito da aplicação de herbicidas. Para a realização dos testes de composição química, foram utilizados grãos somente da segunda safra (2017-Unai-MG). Os grãos foram moídos duas vezes em moíno industrial de faca tipo Willy. E a farinha foi armazenada em potes de plástico e envolvida por filtro de PVC, acondicionadas sob temperatura de 5°C, sequentemente, foram avaliadas. Todas as análises das parcelas foram realizadas em triplicata.

Teor de lipídeos

A extração de lipídios foi realizada por lixiviação exaustiva utilizando éter etílico como solvente orgânico, seguida de remoção por evaporação do solvente utilizado. As amostras secas da farinha foram acondicionadas em cartuchos de papel e colocadas no aparelho extrator soxhlet que foram mantidas em aquecimento por 6 horas em chapa aquecedora. Por duas horas os cartuchos foram secos em estufa a 105°C e posteriormente pesadas para determinar o teor de lipídeos.

Umidade, cinzas e proteínas

A determinação do teor de água foi realizada pela técnica gravimétrica com uso de calor. As amostras foram acondicionadas em recipientes pesados previamente e colocados em estufas a 105° por três horas. Transcorrido o tempo, foram resfriadas em dessecador e pesadas.

As cinzas foram determinadas submetendo 5.0g da amostra em cadinho previamente calcinado e incineradas em forno mufla a 550° por 24 horas. Posteriormente foram resfriadas em dessecador e pesadas.

O teor de nitrogênio foi determinado através do analisado elementar LECO® CHNS/O, modelo TruSpec Micro. Amostras de 2 mg foram incineradas em estufa a 1075° em tudo de quartzo. E para determinação do teor de proteína, a amostra foi multiplicada pelo fator de correção de 6,25.

Teor de fibra bruta, carboidrato, compostos fenólicos e antocianinas

Amostras de 0,5 g foram adicionadas em tubos de ensaio, após, foram adicionadas 17,5 ml de ácido acético 70% e 0,5 g de ácido tricloroacético. Em capela, foram adicionadas aos tubos, 1,2 ml de ácido nítrico. As amostras foram digeridas por 30 minutos em bloco digestor. Foram filtradas em cadinho de fundo furado, preenchidos com lã de vidro, previamente tarado, logo após foram secas em estufa 105° até atingirem peso constante.

O teor de carboidratos foi calculado por comparação em base seca: (% de carboidratos = 100 - [% de teor de humidade +% de proteína +% de lipídios +% de cinzas +% de fibra bruta]).

Os teores de fenóis totais foram determinados utilizando o método de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965). Para antocianinas foi utilizado o método do pH diferencial (AOAC, 2005).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, as médias foram comparados ao teste de Tukey ($p < 0,05$) com o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2014).

Resultados

O herbicida glufosinate reduziu a produção do isohibrido de milho para 2.048 kg ha⁻¹. Os demais genótipos não foram afetados pela aplicação do ammonium glufosinate, atrazine e nicosulfuron. Esses tratamentos apresentaram média de produção de 8.425 kg ha⁻¹ (Tabela 01). A aplicação do nicosulfuron também reduziu o peso de mil grãos no isohibrido e Herculex (Tabela 01).

Tabela 01. Produção e peso de mil grãos de milho GM sob efeito da aplicação dos herbicidas atrazine (atr), ammonium glufosinate (glu), nicosulfuron (nic) e Testemunha (Test).

Herbicidas	Produção kg/ha		
	Herculex	Isohibrido	Power Core
Atr	8.675 Aa	8.510 Aa	9.579 Aa
Nic	7.855 Aa	8.261 Aa	8.604 Aa
Glu	7.332 Aa	2.048 Bb	9.084 Aa
Atr + nic	9.049 Aa	9.670 Aa	8.153 Aa
Test	6.919 Aa	7.641 Aa	8.595 Aa

Herbicidas	Peso de mil grãos (g)		
	Herculex	Isohibrido	Power Core
Atr	287,48± 5,24 ^{Aa}	278,48± 4,69 ^{Aa}	290,43± 6,23 ^{Aa}
Nic	281,91 ±10,53 ^{Aab}	263,92±11,12 ^{ABa}	291,00± 6,89 ^{Aa}
Glu	271,92± 6,04 ^{Aa}	253,15± 10,40 ^{Bb}	291,37± 11,92 ^{Aa}
Atr + Nic	289,65 ± 10,58 ^{Aa}	283,45± 4,08 ^{Aa}	290,80± 6,09 ^{Aa}
Test	290,85 ± 12,62 ^{Aa}	273,90± 7,59 ^{ABa}	281,65± 10,32 ^{Aa}

*Letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas iguais na coluna não diferiram entre si pelo test Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As reduções de produção e peso de mil grãos, e redução do peso de mil grãos com aplicação no herbicida nicosulfuron não afetaram a composição química dos grãos (Tabela 01). Os herbicidas não alteraram a composição química dos grãos entre os genótipos GM, Herculex e Power Core, e do isohibrido ($p < 0.05$). A umidade média percentual foi 10,28%, lipídios 6,77%, proteínas 10,56%, fibra bruta 3,86%, cinzas 1,89% e carboidratos 66,62% (Tabela 02 e 03).

Tabela 02. Umidade, lipídeos e proteína de grãos de milho GM sob efeito da aplicação de herbicidas atrazine (atr), ammonium glufosinate (glu), nicosulfuron (nic) e Testemunha (Test).

Herbicidas	Umidade (%)		
	Herculex	Isohibrido	Power Core
Atr	10,32 ± 0,16 ^{Aa}	10,19 ± 0,75 ^{Aa}	10,82± 0,82 ^{Aa}
Nic	10,12 ± 0,68 ^{Aa}	10,29 ± 0,56 ^{Aa}	10,66± 0,66 ^{Aa}
Glu	10,19± 0,88 ^{Aa}	10,50± 0,89 ^{Aa}	10,41± 0,43 ^{Aa}
Atra + Nic	10,11 ± 0,79 ^{Aa}	10,03± 0,61 ^{Aa}	10,89± 0,62 ^{Aa}
Test	9,62 ± 0,76 ^{Aa}	9,95± 0,89 ^{Aa}	10,16± 0,42 ^{Aa}
Teor de Lipídeos (%)			
Atr	6,57 ± 0,44 ^{Aa}	6,08 ± 1,21 ^{Aa}	6,26± 0,29 ^{Aa}
Nic	6,48 ± 1,18 ^{Aa}	6,08 ± 0,68 ^{Aa}	6,74± 1,21 ^{Aa}
Glu	6,29± 0,73 ^{Aa}	5,67± 1,76 ^{Aa}	6,98± 0,39 ^{Aa}
Atr + Nic	7,59 ± 1,05 ^{Aa}	6,82± 0,40 ^{Aa}	6,82± 1,26 ^{Aa}
Test	6,62 ± 0,78 ^{Aa}	6,28± 1,15 ^{Aa}	6,72± 0,39 ^{Aa}
Teor de Proteína (%)			
Atr	10,72 ± 1,00 ^{Aa}	10,30 ± 0,80 ^{Aa}	11,07± 0,60 ^{Aa}
Nic	10,82 ± 0,80 ^{Aa}	10,30± 0,90 ^{Aa}	10,82± 0,60 ^{Aa}
Glu	10,65± 1,00 ^{Aa}	10,55± 0,60 ^{Aa}	10,22± 0,50 ^{Aa}
Atr+ Nic	11,12 ± 0,70 ^{Aa}	10,22± 0,60 ^{Aa}	10,37± 0,30 ^{Aa}
Test	10,45 ± 0,60 ^{Aa}	10,37± 1,20 ^{Aa}	10,40± 0,30 ^{Aa}

*Letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas iguais na coluna não diferiram entre si pelo test Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 03. Teor de fibra bruta, cinzas e carboidratos de grãos de milho GM sob efeito da aplicação de herbicidas atrazine (atr), ammonium glufosinate (glu), nicosulfuron (nic) e Testemunha (Test).

Herbicidas	Teor de Fibra bruta (%)		
	Herculex	Isohibrido	Power Core
Atr	3,57± 0,65 ^{Aa}	3,76± 0,27 ^{Aa}	4,23± 1,01 ^{Aa}
Nic	3,73 ± 0,39 ^{Aa}	3,13± 0,93 ^{Aa}	3,99± 0,62 ^{Aa}
Glu	3,57± 0,95 ^{Aa}	3,53± 0,43 ^{Aa}	4,07± 0,80 ^{Aa}

Atr + Nic	4,37 ± 0,74 ^{Aa}	3,97± 0,28 ^{Aa}	3,72± 0,27 ^{Aa}
Test	3,73 ± 0,35 ^{Aa}	4,37± 0,60 ^{Aa}	4,19± 0,48 ^{Aa}
Teor de Cinzas (%)			
Atr	2,10± 0,28 ^{Aa}	1,93± 0,11 ^{Aa}	1,85± 0,40 ^{Aa}
Nic	1,88 ±0,24 ^{Aa}	1,75±0,08 ^{Aa}	1,87± 0,26 ^{Aa}
Glu	1,85± 0,19 ^{Aa}	1,90± 0,33 ^{Aa}	1,86± 0,35 ^{Aa}
Atr + Nic	2,26 ± 0,18 ^{Aa}	1,89± 0,29 ^{Aa}	1,86± 0,22 ^{Aa}
Test	1,93 ± 0,33 ^{Aa}	1,78± 0,19 ^{Aa}	1,67± 0,20 ^{Aa}
Carboidratos (%)			
Atr	66,72± 1,07 ^{Aa}	67,18± 2,57 ^{Aa}	65,73± 1,40 ^{Aa}
Nic	67,01±1,83 ^{Aa}	68,42±1,92 ^{Aa}	65,92± 1,44 ^{Aa}
Glu	67,43± 2,80 ^{Aa}	67,83± 1,95 ^{Aa}	66,45± 0,58 ^{Aa}
Atr+ Nic	64,56 ± 2,04 ^{Aa}	67,04± 1,16 ^{Aa}	66,31± 1,62 ^{Aa}
Test	67,66 ± 1,96 ^{Aa}	64,28± 2,26 ^{Aa}	66,85± 0,88 ^{Aa}

*Letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas iguais na coluna não diferiram entre si pelo test Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Não foram observadas diferenças entre os teores de açúcares redutores totais, teor de fenóis, teor de sólidos solúveis e acidez total titulável ($p < 0.05$). Para as antocianinas em todos os tratamentos foram observados traços, baixos para quantificação. Os valores médios de teores foram 0,040 g AR/ g para açúcares não redutores na base úmida, 0,53 mg L⁻¹ de ácido gálico para fenóis totais 0,15% para sólidos e solúveis e 4,5% para acidez titulável (Tabela 04 e 05).

Tabela 04. Acidez total titulável e teor de sólidos solúveis de grãos de milho GM sob efeito da aplicação de herbicidas atrazine (atr), ammonium glufosinate (glu), nicosulfuron (nic) e Testemunha (Test).

Herbicidas	Acidez total titulável (%)		
	Herculex	Isohibrido	Power Core
Atr	4,49± 0,75 ^{Aa}	4,55± 0,79 ^{Aa}	4,92± 1,01 ^{Aa}
Nic	5,01 ±0,93 ^{Aa}	4,39±0,21 ^{Aa}	4,92± 1,01 ^{Aa}
Glu	4,14± 0,34 ^{Aa}	4,43± 0,49 ^{Aa}	4,59± 0,93 ^{Aa}

Atr + Nic	4,83 ± 0,90 ^{Aa}	4,34± 0,57 ^{Aa}	4,92± 0,88 ^{Aa}
Test	4,60 ± 1,04 ^{Aa}	3,91± 1,16 ^{Aa}	4,56± 1,11 ^{Aa}
Teor de sólidos solúveis			
Atr	0,179± 0,05 ^{Aa}	0,175± 0,09 ^{Aa}	0,225± 0,09 ^{Aa}
Nic	0,125 ± 0,05 ^{Aa}	0,175±0,09 ^{Aa}	0,100± 0,00 ^{Aa}
Glu	0, 125± 0,08 ^{Aa}	0,200± 0,08 ^{Aa}	0,200± 0,08 ^{Aa}
Atr + Nic	0,150 ± 0,05 ^{Aa}	0,175± 0,04 ^{Aa}	0,200± 0,05 ^{Aa}
Test	0,200 ± 0,081 ^{Aa}	0,125± 0,05 ^{Aa}	0,150± 0,05 ^{Aa}

*Letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas iguais na coluna não diferiram entre si pelo test Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 05. Teor de fenóis totais e teor de açúcares redutores Acidez de grãos de milho GM sob efeito da aplicação de herbicidas atrazine (atr), ammonium glufosinate (glu), nicosulfuron (nic) e Testemunha (Test).

Herbicidas	Teor de fenóis totais (mg L ⁻¹ ácido gálico)		
	Herculex	Isohibrido	Power Core
Atr	0,562± 0,02 ^{Aa}	0,515± 0,00 ^{Aa}	0,522± 0,00 ^{Aa}
Nic	0,542 ± 0,03 ^{Aa}	0,507±0,00 ^{Aa}	0,547± 0,04 ^{Aa}
Glu	0, 547± 0,03 ^{Aa}	0,520± 0,03 ^{Aa}	0,536± 0,08 ^{Aa}
Atr + Nic	0,522 ± 0,01 ^{Aa}	0,540± 0,02 ^{Aa}	0,547± 0,02 ^{Aa}
Test	0,527 ± 0,01 ^{Aa}	0,532± 0,01 ^{Aa}	0,542± 0,04 ^{Aa}
Açúcares redutores totais na base úmida (g AR/g)			
Nic	0,049± 0,001 ^{Aa}	0,047± 0,007 ^{Aa}	0,052± 0,002 ^{Aa}
Atr	0,030 ± 0,00 ^{Aa}	0,034±0,01 ^{Aa}	0,029± 0,007 ^{Aa}
Atr + Nic	0,036± 0,001 ^{Aa}	0,038± 0,004 ^{Aa}	0,034± 0,007 ^{Aa}
Glu	0,050 ± 0,007 ^{Aa}	0,054± 0,00 ^{Aa}	0,060± 0,001 ^{Aa}
Test	0,03± 0,001 ^{Aa}	0,031± 0,007 ^{Aa}	0,032± 0,008 ^{Aa}

*Letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas iguais na coluna não diferiram entre si pelo test Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Discussão

A avaliação dos nutrientes é um dos aspectos mais importantes da avaliação da segurança alimentar dos organismos geneticamente modificados GM, sendo usadas para inferências sobre a equivalência dos alimentos OGM e convencionais (Huang, 2017). Diante disso, a segurança desses alimentos precisam ser comprovadas em plantas tratadas em campo com diferentes técnicas de manejo, entre elas, a aplicação de herbicidas. Em relatórios sobre a segurança dos alimentos GM, não foram observadas alterações na composição química de milho GM com tolerância ao glyphosate comparadas ao seu isogênico (Osborne et al., 2016).

A redução na produção e peso de mil grãos do isohíbrido com aplicação do ammonium glufosinate é reflexo do mecanismo de ação do herbicida. O ammonium glufosinate age inibindo a síntese da glutamina sintetase, enzima responsável pela conversão do amônio a glutamato (Fernández Pablo et al., 2016; Yeo et al., 2018). Em plantas sensíveis o herbicida provocará acúmulo expressivo de amônio no interior celular provocando rompimento das estruturas celulares, seguido de clorose, necrose e morte do tecido vegetal (Jalaludin et al., 2017). O dano no metabolismo de nitrogênio pode também interferir no balanço de C/N, afetando a fotossíntese e o metabolismo de carbono (Yeo et al., 2018). A tolerância dos genótipos Herculex e Power Core ao herbicida ammonium glufosinate só é possível pela inserção do gene *pat* que codifica a enzima fosfinotricina acetil transferase responsável pela inativação da ação do herbicida (Debode et al., 2018). As presenças desses transgenes em eventos justificaram a necessidade de comprovar a tolerância desses genótipos GM aos herbicidas atrazine e nicosulfuron. Mesmo com redução no peso de mil grãos no genótipo Herculex com o nicosulfuron, os genótipos Power Core e Herculex mantiveram tolerância aos herbicidas. Acredita-se que a tolerância ao nicosulfuron mantida após a transformação genética é governada pela ação de um gene recessivo do citocromo P450 (Reynoso et al., 2018; Liu et al., 2018). Além disso, a tolerância pode ser atribuída a taxas diferenciadas de metabolismo do herbicida. Culturas tolerantes desintoxicam herbicidas mais rapidamente do que plantas suscetíveis, sendo o metabolismo governado pelos genes da família P450 (Liu et al., 2015; Reynoso et al., 2018; Sun et al., 2018; Liu et al., 2018). Os baixos valores para o peso de mil grãos com o herbicida nicosulfuron, não afetaram os valores de produção dos genótipos submetidos ao herbicida. Alterações em nível bioquímico com aplicação do nicosulfuron foram

encontradas em outras pesquisas (Cutulle et al., 2018). A aplicação de nicosulfuron resultou em aumento no conteúdo de proteínas, fibras e minerais em milho doce convencional (*Zea mays* L. var. *Rugosa*) (Cutulle et al., 2018). Segundos os autores, a proteína aumentou em 7%, enquanto as fibras aumentaram 9% e 16% no total de açúcares, sugerindo ser consequência de interrupções nas vias bioquímicas. Os resultados sugerem sensibilidade diferencial para os genótipos de milho ao nicosulfuron (Cutulle et al., 2018). Nessa pesquisa, os resultados corroboraram a tolerância mantida nos genótipos GM após à aplicação do nicosulfuron.

Estudos considerando o efeito de diferentes transgenes na composição bioquímica de grãos ou folhas de milho são necessários (Bernillon et al., 2018). A modificação genética afeta menos a composição de grãos do que o efeito do ambiente e do genótipo (Bernillon et al., 2018; Chen et al., 2016), constatação essa evidenciada pelos resultados observados neste trabalho. Os teores de proteína, lipídeos e carboidratos ficaram dentro do percentual relatado na literatura, considerados normais para grãos de milho: proteína, 6 a 12%, lipídeos, 3 a 6% e carboidratos, 61 a 78% (Ai e Jane, 2016; Preston, 2016). Por outro lado, resultados diferentes foram encontrados por outros autores. Os genótipos transgênicos 2B587Hx em condições naturais apresentaram maiores teores de carboidratos, cinzas e fibra bruta, com 75.3, 1.08 e 1.00%, respectivamente em comparação a sua parte isogênica (Marques et al., 2016). Sob efeito da aplicação de herbicidas, diferenças a níveis de proteoma e metaboloma foram encontradas entre genótipos de milho NK603 com ou sem pulverização com glyphosate durante o cultivo (Mesnage et al., 2016). A variedade NK603 possui o mesmo evento componente do genótipo Power Core (MON89034 & TC1507 & NK603) utilizada nessa pesquisa. A diferença em nível de proteoma se deve a inserção do transgenes. O processo de transformação e a expressão geral resultante de uma proteína transgênica (EPSPS) causaram, em outra pesquisa, perturbação geral na planta GM, promovendo estresse oxidativo e desequilíbrio no metabolismo de energia e carboidratos (Mesnage et al., 2016). Alterações no conteúdo proteico também foram observadas em milho GM MON810 comparado ao isogênico (Agapito-Tenfen et al., 2013) e NK603 e MON810 com tolerância ao glyphosate (Bernillon et al., 2018). Contudo, nessa pesquisa não se observou diferença dos resultados encontrados para os genótipos com o gene *pat* avaliados. Entretanto, pesquisas a nível proteoma, metaboloma se justificam pela necessidade da utilização desses como alimento. Em nível de sensibilidade aos herbicidas nicosulfuron e atrazine, os

testes realizados são suficientes para afirmar a segurança da aplicação desses herbicidas sob os genótipos Power Core e Herculex. Análises de composição de grãos como as empregadas nesse trabalho são comumente descritas como estratégia para avaliar a segurança dos alimentos GM, conceituadas como equivalência substancial (Vidal et al., 2015). E é um padrão internacionalmente reconhecido que mede se o alimento ou cultura GM compartilha as mesmas características sanitárias e nutricionais com sua contraparte convencional (Vidal et al., 2015).

Os compostos fenólicos são responsáveis pela maior parte da atividade antioxidante em grãos de milho (Beta e Hwang, 2018). Dessa forma, os baixos valores não quantificados de antocianinas são justificados. Enquanto isso, cerca de 80% do total de fenólicos em milho estão representados na forma ligada. E pequena parte, entre 18 a 23% estão na forma livre (Lopez-Martinez et al., 2009). Os baixos valores encontrados para o teor de fenóis totais pode ser resultado da subestimação. Além disso, o aumento do conteúdo de fenólico pode também se relacionar a capacidade de eliminar espécies radicais, impedindo assim a propagação de reações em cadeias oxidativas (Hichem et al., 2009). Os grãos integrais de cereais são boas fontes de compostos fenólicos, antocianinas, quininas, flavonóis, flavonas e aminoácidos. Esta ampla gama de fitoquímicos possui potencial antioxidante (Masisi et al., 2016). O resultado é uma evidencia de que, por ocasião da amostragem, não há qualquer efeito residual dos herbicidas no estresse oxidativo dos grãos, portanto, não induziram aumento no teor de fenóis e antocianinas.

Conclui-se que os herbicidas atrazine e nicosulfuron, são opções em programa de manejo de plantas daninhas de difícil controle nos genótipos de milho GM Herculex e PowerCore, incluindo eventuais biótipos que venham a ser resistentes ao ammonium glufosinate

Referências

AOAC-Association of official analytical chemists Gaithersburg, USA: AOAC International The Scientific Association (2005).

Agapito-Tenfen, S.Z., Guerra, M.P., Wikmark, O.-G., Nodari, R.O., 2013. Comparative proteomic analysis of genetically modified maize grown under different agroecosystems conditions in Brazil. *Proteome Science* 11, 46.

Ai, Y., Jane, J., 2016. Macronutrients in Corn and Human Nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15, 581–598.

Aulakh, J.S., Jhala, A.J., 2015. Comparison of Glufosinate-Based Herbicide Programs for Broad-Spectrum Weed Control in Glufosinate-Resistant Soybean. *Weed Technology* 29, 419–430.

Beckie, H.J., Hall, L.M., 2014. Genetically-modified herbicide-resistant (GMHR) crops a two-edged sword? An Americas perspective on development and effect on weed management. *Crop Protection* 66, 40–45.

Bernillon, S., Maucourt, M., Deborde, C., Chéreau, S., Jacob, D., Priymenko, N., Laporte, B., Coumoul, X., Salles, B., Rogowsky, P.M., Richard-Forget, F., Moing, A., 2018. Characterization of GMO or glyphosate effects on the composition of maize grain and maize-based diet for rat feeding. *Metabolomics* 14, 36.

Beta, T., Hwang, T. 2018. Influence of heat and moisture treatment on carotenoids, phenolic content, and antioxidant capacity of orange maize flour. *Food Chemistry* 246: 58-64.

Bonny, S., 2016. Genetically Modified Herbicide-Tolerant Crops, Weeds, and Herbicides: Overview and Impact. *Environmental Management* 57, 31–48.

Chen, M., Rao, R.S.P., Zhang, Y., Zhong, C., Thelen, J.J. 2016. Metabolite variation in hybrid corn grain from a large-scale multisite study. *The Crop Journal* 4(1): 177-187

Cong, B., Maxwell, C., Luck, S., Vespestad, D., Richard, K., Mickelson, J., Zhong, C., 2015. Genotypic and Environmental Impact on Natural Variation of Nutrient Composition in 50 Non Genetically Modified Commercial Maize Hybrids in North America. *J. Agric. Food Chem.* 63, 5321–5334.

Cutulle, M.A., Armel, G.R., Kopsell, D.A., Wilson, H.P., Brosnan, J.T., Vargas, J.J., Hines, T.E., Koepke-Hill, R.M., 2018. Several Pesticides Influence the Nutritional Content of Sweet Corn. *J. Agric. Food Chem.* 66, 3086–3092.

Debode, F., Janssen, É., Berben, G., 2018. Development of PCR screening assays focused on gene-coding sequences for GMO detection. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12.

Dong, F., Mitchell, P.D., Davis, V.M., Recker, R., 2017. Impact of atrazine prohibition on the sustainability of weed management in Wisconsin maize production. *Pest Management Science* 73, 425–434.

Fernández Pablo, Alcántara Ricardo, Osuna María D, Vila-Aiub Martin M, Prado Rafael De, 2016. Forward selection for multiple resistance across the non-selective glyphosate, glufosinate and oxyfluorfen herbicides in *Lolium* weed species. *Pest Management Science* 73, 936–944.

Ferreira, D.F. 2014. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência Agrotécnica* 38(2): 109-112.

Gaines, T.A., 2018. The Importance of Glyphosate in Non-GM Settings [WWW Document]. https://doi.org/info:doi/10.1564/v29_dec_05

Gayen, D., Paul, S., Sarkar, S.N., Datta, S.K., Datta, K., 2016. Comparative nutritional compositions and proteomics analysis of transgenic Xa21 rice seeds compared to conventional rice. *Food Chemistry* 203, 301–307.

Green, J.M., 2018. The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science* 74, 1035–1039.

Herman, R.A., Ekmay, R.D., Schafer, B.W., Song, P., Fast, B.J., Papineni, S., Shan, G., Juberg, D.R., 2018. Food and feed safety of DAS-44406-6 herbicide-tolerant soybean. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 94, 70–74.

Hichem, H., Mounir, D., Naceur, E.A. 2009. Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: Changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. *Industrial Crops and Products* 30(1): 144-151.

Hou, X., Huang, X., Ai, Z., Zhao, J., Zhang, L., 2017. Ascorbic acid induced atrazine degradation. *Journal of Hazardous Materials* 327, 71–78.

Huang, K., 2017. Nutrient Assessment of GMOs, in: Huang, K. (Ed.), *Safety Assessment of Genetically Modified Foods*. Springer Singapore, Singapore, pp. 15–62.

Jalaludin, A., Yu, Q., Zoellner, P., Beffa, R., Powles, S.B., 2017. Characterisation of glufosinate resistance mechanisms in *Eleusine indica*. *Pest Management Science* 73, 1091–

Ji, Y., Dong, C., Kong, D., Lu, J., Zhou, Q., 2015. Heat-activated persulfate oxidation of atrazine: Implications for remediation of groundwater contaminated by herbicides. *Chemical Engineering Journal* 263, 45–54.

Kong, X., Jiang, J., Ma, J., Yang, Y., Liu, W., Liu, Y., 2016. Degradation of atrazine by UV/chlorine: Efficiency, influencing factors, and products. *Water Research* 90, 15–23.

Liu, X., Xu, X., Li, B., Wang, X., Wang, G., Li, M., 2015. RNA-Seq Transcriptome Analysis of Maize Inbred Carrying Nicosulfuron-Tolerant and Nicosulfuron-Susceptible Alleles. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 5975–5989.

Liu, X., Xu, X., Li, B., Yao, X., Zhang, H., Wang, G., Han, Y. 2018. *Journal of Integrative Agriculture* 17(8): 1790-1799.

Lopez-Martinez, L.X., Oliart-Ros, R.M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C., Parkin, K.L., Garcia, H.S.2009. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT - Food Science and Technology* 42(6): 1187-1192.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA- Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - Agrofit. 2018. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: abril de 2018.

Marques, L.H., 2016. Chemical properties and water absorption kinetics of transgenic corn grain (2B587 Hx) and its conventional isolate (2B587). *Journal of Cereal Science* 71, 93–98.

Masisi, K., Beta, T., Moghadasian, M.H., 2016. Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chemistry* 196, 90–97.

Mesnage, R., Agapito-Tenzen, S.Z., Vilperte, V., Renney, G., Ward, M., Seralini, G.-E., Nodari, R.O., Antoniou, M.N., 2016. An integrated multi-omics analysis of the NK603 Roundup-tolerant GM maize reveals metabolism disturbances caused by the transformation process. *Scientific Reports* 6.

Osborne, S.L., Lehman, R.M., Rosentrater, K.A., 2016. Grain and biomass nutrient uptake of conventional corn and their genetically modified isolines. *Journal of Plant Nutrition* 39, 2047–2055.

Preston, R.L. 2016. Feed composition tables. Beef Magazine, 16-34.

Reynoso, M.S., Alvarez, C.M., Cruz, L.L.D. la, L, J.F.G., eros, SÃ¡nchez, J.J.G., Villalobos, A.R.A., 2018. Genetic damage in Mexican and South American sweet corn varieties due to the use of herbicides (Nicosulfuron and Topramezone). Genetics and Molecular Research 17.

Sarabi, V., Ghanbari, A., Mohassel, M.H.R., Mahallati, M.N., Rastgoo, M., 2018. Interaction of foramsulfuron or nicosulfuron with 2,4-D + MCPA on important broadleaf weeds in corn (*Zea mays* L.). Plant Production Science 21, 203–214.

Schütte, G., Eckerstorfer, M., Rastelli, V., Reichenbecher, W., Restrepo-Vassalli, S., Ruohonen-Lehto, M., Saucy, A.-G.W., Mertens, M., 2017. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. Environmental Sciences Europe 29: 5.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-156.

Sun, L., Wu, R., Su, W., Gao, Z., Lu, C., 2017. Physiological basis for isoxadifen-ethyl induction of nicosulfuron detoxification in maize hybrids. PLOS ONE 12, e0173502.

Sun, L., Xu, H., Su, W., Xue, F., An, S., Lu, C., Wu, R. 2018. The expression of detoxification genes in two maize cultivars by interaction of isoxadifen-ethyl and nicosulfuron. Plant Physiology and Biochemistry 129: 101-108.

Tang, W., Hazebroek, J., Zhong, C., Harp, T., Vlahakis, C., Baumhover, B., Asiago, V., 2017. Effect of Genetics, Environment, and Phenotype on the Metabolome of Maize Hybrids Using GC/MS and LC/MS. J. Agric. Food Chem. 65, 5215–5225.

Vidal, N., Barbosa, H., Jacob, S., Arruda, M., 2015. Comparative study of transgenic and non-transgenic maize (*Zea mays* L.) flours commercialized in Brazil, focussing on proteomic analyses. Food Chemistry 180, 288–294.

Wang, J., Zhong, X., Li, F., Shi, Z., 2018. Effects of nicosulfuron on growth, oxidative damage, and the ascorbate-glutathione pathway in paired nearly isogenic lines of waxy maize (*Zea mays* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology 145, 108–117.

Yeo, B.-S., Chu, W.-L., Wong, C.-Y., Kok, Y.-Y., Phang, S.-M., Tan, B.-K., Mustafa, E.M., 2018. Combined effects of glufosinate ammonium and temperature on the growth, photosynthetic pigment content and oxidative stress response of *Chlorella* sp. and *Pseudokirchneriella subcapitata*. J Appl Phycol 30, 3043–3055.

CONCLUSÃO GERAL

A aplicação dos herbicidas atrazine e nicosulfuron não apresentam riscos a segurança, composição e rendimentos dos grãos, podendo ser aplicados em programas de manejo de plantas daninhas para os genótipos GM, Herculex e PowerCore. Os efeitos observados sobre a fisiologia vegetal e estresse oxidativo não afetaram a composição e muito menos o rendimento de grãos e alocação de matéria fresca e seca dos genótipos. Assim, recomenda-se a aplicação desses herbicidas em programas de manejo na prevenção da ocorrência de plantas daninhas resistentes aos herbicidas glyphosate e glufosinato de amônio.