

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE
E BIOTECNOLOGIA APLICADA

DISSERTAÇÃO

Tolerância de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp.) a
Herbicidas Utilizando Plantas Micropropagadas

Rafaela Andrade Dias

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**TOLERÂNCIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) A
HERBICIDAS UTILIZANDO PLANTAS MICROPROPAGADAS**

RAFAELA ANDRADE DIAS

Sob a Orientação do Professor
Dr. Jair Felipe Garcia Pereira Ramalho

e Co-orientação do Professor
Dr. Carlos Frederico de Menezes Veiga

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em **Biotecnologia Aplicada**.

Seropédica, RJ
Abril de 2013

633.61

D541t

T

Dias, Rafaela Andrade, 1984 -

Tolerância de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) a herbicidas utilizando plantas micropropagadas / Rafaela Andrade Dias. - 2013.

101 f.: il.

Orientador: Jair Felipe Garcia Pereira Ramalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada.

Bibliografia: f. 91-101.

1. Cana-de-açúcar - Teses. 2. Cana-de-açúcar - Propagação in vitro - Teses. 3. Plantas - Efeito de herbicidas - Teses. I. Ramalho, Jair Felipe Garcia Pereira, 1954-II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. III. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA

TOLERÂNCIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) A HERBICIDAS
UTILIZANDO PLANTAS MICROPROPAGADAS

RAFAELA ANDRADE DIAS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em **Biotecnologia Aplicada**.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 22/04/2013

BANCA EXAMINADORA:

Jair Felipe Garcia Pereira Ramalho. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Eduardo Lima. Dr. UFRRJ

Heroldo Weber. Dr. UFPR

DEDICATÓRIA

A minha querida família, pelo apoio incondicional, compreensão, incentivo e carinho não só durante a realização deste trabalho, mas em todas as etapas da minha vida, torcendo sempre pelo meu sucesso. A vocês dedico a minha conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar e guiar meus caminhos.

A minha mãe Beny e ao meu pai Dias, por serem exemplos de pais, de amor, de vida e por serem únicos em me escutar e em acreditar em mim e no meu futuro.

À minha avó Rosa por ser tão boa e dedicada em me fazer bem, que só tenho a agradecer a Deus por ela ser viva para ver minhas realizações.

Ao meu tio Lúcio por ser sempre carinhosamente presente na minha vida pessoal e profissional além de ter contribuído diretamente na execução desse trabalho com suas sábias sugestões.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Campus Campos dos Goytacazes pelo apoio ao desenvolvimento deste estudo.

Ao Curso de Pós Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada/ Departamento de Entomologia e Fitopatologia/ Instituto de Biologia/ UFRRJ pela a oportunidade de realizar o mestrado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador Dr. Jair Felipe Garcia Pereira Ramalho e ao meu co- orientador Dr. Carlos Frederico de Menezes Veiga, por todos os ensinamentos, paciência, incentivo e empenho para o êxito do trabalho.

À todos os professores do PPGFBA pelos conhecimentos compartilhados durante o curso.

À coordenadora do PPGFBA Dr^a. Elen de Lima Aguiar Menezes por não medir esforços em ajudar seus alunos.

Ao professor Dr. Eurípedes Barsanulfo Menezes pela amizade, carinho, compreensão, sabedoria e valiosos conselhos.

Ao professor Dr. Valdir Diola por ser sempre solícito nos momentos que precisei.

Ao secretário do PPGFBA Roberto Tadeu Souza de Oliveria por toda a atenção, tempo, dedicação e prestatividade no decorrer do curso.

À todos os funcionários da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Campus Campos dos Goytacazes pelo apoio, em destaque: Cyclere, Beth, Geraldo e Gil pela amizade e em especial ao Sr. Luiz por todo o empenho e envolvimento para a conclusão da pesquisa.

Aos funcionários da Biofábrica da UFRRJ/ Campos dos Goytacazes pela ajuda, em especial à Verônica Coutinho e a Pesquisadora/Doutoranda Roberta Ribeiro Barbosa, por toda a amizade durante minha estadia em Campos dos Goytacazes e pelo auxílio no que foi necessário.

Aos meus amigos do mestrado Vinícius de Abreu D' Ávila, Diene Elen Miranda da Silva, Tathiane Pastana de Sousa Poltronieri, Natália Arruda Sanglard e Francisco Lúcio da Silva Beltrão por serem responsáveis em me deixar numa eterna nostalgia dos últimos dois anos, vocês fizeram a diferença nessa etapa da minha vida.

À minha amiga Luana Albuquerque de Araujo em ser ímpar em amizade, por me apoiar antes mesmo de conseguir a admissão no curso, ser minha cúmplice, minha confidente, e estar junto a mim em todas as ocasiões.

À Ayana Negrão de Jonas pelo carinho, amizade, conselhos, apoio, companheirismo, sendo incrivelmente presente em todos os momentos e por me proporcionar todas as alegrias necessárias para seguir em frente.

A todos meus amigos pela ausência e distância que tivemos nesse período de dois anos, mas que nunca desistiram da nossa amizade.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste estudo.

O meu eterno e sinceros agradecimentos.

RESUMO

DIAS, Rafaela Andrade. **Tolerância de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*) a Herbicidas Utilizando Plantas Micropropagadas.** 2013. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Dois experimentos foram conduzidos na UFRRJ - Campus Campos dos Goytacazes, com o objetivo de avaliar nova metodologia para a diferenciação precoce da tolerância de variedades de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento com herbicidas. Foram instalados dois experimentos, um no sistema de cultura *in vitro* no estágio de multiplicação de plântulas e outro *ex vitro*, na fase de aclimação das plantas micropropagadas. Foram analisadas para o experimento *in vitro* as características número de perfilhos, notas dos sintomas de fitotoxicidade e peso de matéria seca e para o experimento *ex vitro* foram analisadas as características altura, número de perfilhos e notas dos sintomas de fitotoxicidade. Foram utilizadas as seguintes variedades/clones RB98710, RB969017, RB979088, RB951541, RB966928 e SP79-1011. Os herbicidas utilizados foram clomazone, MSMA, diuron, diuron+hexazinona e 2,4-D em três doses distintas mais uma testemunha. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições, em ambos os experimentos. No experimento *in vitro* onde foram utilizadas as variedades RB951541, RB966928 e SP79-1011 e os herbicidas clomazone, MSMA, diuron, os resultados mostraram que houve diferença significativa tolerância a herbicidas entre as variedades, sendo a RB951541 a mais sensível. Para a avaliação da tolerância de variedades de cana-de-açúcar em cultivo *in vitro* aos herbicidas clomazone e diuron, as menores doses utilizadas 1,0 kg i.a./ha e 2,4 kg i.a./ha respectivamente permitiram a distinção para as características notas de sintomas de fitotoxicidade, número de perfilhos e peso da matéria seca. Quanto ao herbicida MSMA essa distinção de doses só foi possível ser observada na característica notas dos sintomas de fitotoxicidade e peso de matéria seca. Os resultados mostraram a possibilidade da aplicação dessa metodologia para a avaliação precoce da tolerância de variedades de cana-de-açúcar aos herbicidas, sendo as características peso da matéria seca e notas dos sintomas de fitotoxicidade as avaliações de melhor eficiência. O segundo experimento avaliou todas as cultivares citadas, com o tratamento executado, na fase de aclimação das mudas aos 50 dias após o transplante para os vasos. As avaliações do experimento com plantas micropropagadas submetidas a doses de herbicidas na fase de aclimação, resultaram na indicação de 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) e da dose 1 dos herbicidas como o mais indicado para a diferenciação das variedades/clones. A metodologia proposta nas doses utilizadas não se mostrou eficiente para a seleção de variedades/clones de cana-de-açúcar quanto à tolerância aos herbicidas diuron e hexazinona + diuron, pois esses herbicidas causaram a morte das plantas em todas as doses. A variedade RB951541 diferiu das demais variedades nos experimentos, tanto com plantas *in vitro*, quanto com as plantas na fase de aclimação, sendo a mais sensível sobre todos os aspectos e em todos os tratamentos, mostrando que as metodologias detectaram a mesma sensibilidade dessa variedade. O mesmo ocorreu na distinção das variedades tolerantes, apesar do experimento *ex vitro* ter mais variedades e herbicidas, o herbicida clomazone, que apresentou resultados conclusivos em ambos os experimentos, indicou que as variedades RB966928 e SP79-1011 seguindo as particularidades de cada experimento, destacaram-se tolerantes em ambos.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, tolerância a herbicidas, plantas micropropagadas

ABSTRACT

DIAS, Rafaela Andrade. **Herbicide Tolerance in Sugarcane (*Saccharum* spp.) Using Micropropagated Plants**. 2013. 102 p. Dissertation (Master Science in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Two experiments were conducted at the UFRRJ - Campos dos Goytacazes, whose aim is to evaluate new methodologies to early differentiation of sugarcane cultivars tolerance subjected to treatment with herbicides. Two experiments were installed, one *in vitro* culture system on stage multiplication and another on *ex vitro*, while acclimatization micropropagated plants phase. The variables to experiment *in vitro* evaluated were number of tillers, symptoms of phytotoxicity and dry weight. The experiment *ex vitro* evaluated was number of tillers, symptoms of phytotoxicity and height. The following sugarcane cultivars were used RB951541, RB966928, RB98710, RB969017, RB979088 and SP79-1011. The herbicides used were clomazone, MSMA, diuron, diuron+hexazinona and 2,4-D with three different doses and a further control plant without application. The experimental design was full randomized with ten repetitions. In the *in vitro* experiment there were used, the cultivars RB951541, RB966928 and SP79-1011 and the herbicides clomazone, MSMA, diuron, the results showed that there were a significant difference in the tolerance to herbicides between the cultivars and the RB951541 was the most sensible. To evaluate the tolerance of sugarcane cultivars to the herbicides clomazone and diuron in *in vitro* culture, the lowest doses of 1,0kg a.i./ha and 2,4 kg a.i./ha allowed the distinction to the notes of fitotoxicity symptoms and dry matter weight characteristics. The results showed the possibility of the application of this methodology to to early detect the tolerance of sugarcane cultivars to herbicides, being the notes of fitotoxicity symptoms and dry matter weight characteristics the ones with better results. The second experiment evaluated all mentioned cultivars, on the acclimatization plants phase, at 50 days after transplant to pots. The evaluations of this experiment resulted in the indication of 21 DAT and the dose 1 of the herbicides as the most indicated parameters to differentiate the cultivars. The proposed methodology, in the used doses, was not efficient to select sugarcane cultivars to the tolerance to diuron and diuron + hexazinona, because these products caused the death of all plants, in all the doses. The cultivar RB951541 was the most sensible to the herbicides, in all the characteristics evaluated and in both experiments, showing that the methodologies used detected the same sensibility. The same happened in the distinction of the tolerant cultivars, with the cultivars RB966928 and SP79-1011 being the most tolerant.

Key Words: sugarcane, herbicides tolerance, micropropagated plants.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. (A) imersão da faca de corte em solução de NaClO; (B) corte da plântula; (C) limpeza da fonte de explante.	47
Figura 2. Preparação para inoculação dos explantes - tubos de ensaio com pontes de papel, prontos para receber o meio de cultura e serem autoclavados.	48
Figura 3. Desinfestação da fonte de explante.....	48
Figura 4. (A) obtenção do explante - extração do meristema apical; (B) explante; (C) explantes desenvolvendo em tubos de ensaio contendo meio de cultura; (D) explantes transferidos para um frasco de vidro maior com meio de cultura para completar seu desenvolvimento.....	50
Figura 5. (A) plântula pronta para ser repicada; (B) processo de repicagem.....	51
Figura 6. Plântula em meio de cultura de enraizamento, desenvolvendo raízes adventícias. .	51
Figura 7. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.	58
Figura 8. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.	59
Figura 9. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.	59
Figura 10. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.	59
Figura 11. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.	60
Figura 12. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.	60
Figura 13. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.	60
Figura 14. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.	61
Figura 15. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.	61
Figura 16. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de	

variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	62
Figura 17. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	62
Figura 18. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	63
Figura 19. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	63
Figura 20. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	64
Figura 21. Média do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	64
Figura 22. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	65
Figura 23. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	65
Figura 24. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	66

Figura 25. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	66
Figura 26. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	67
Figura 27. Média do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	67
Figura 28. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	68
Figura 29. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	68
Figura 30. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	68
Figura 31. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida Diuron. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	69
Figura 32. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida Diuron. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	69
Figura 33. Média do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>in vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida Diuron. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	70

Figura 34. Sequência de notas do grau de injúria – sintomas de fitotoxicidade, causado pelo tratamento com o herbicida Clomazone.	72
Figura 35. Sequência de notas do grau de injúria – sintomas de fitotoxicidade, causado pelo tratamento com o herbicida Diuron.	72
Figura 36. Sequência de notas do grau de injúria – sintomas de fitotoxicidade, causado pelo tratamento com o herbicida MSMA.	73
Figura 37. Sequência de notas do grau de injúria – sintomas de fitotoxicidade, causado pelo tratamento com o herbicida Hexazinona + Diuron.....	73
Figura 38. Sequência de notas do grau de injúria – sintomas de fitotoxicidade, causado pelo tratamento com o herbicida 2,4-D	74
Figura 39. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	74
Figura 40. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	75
Figura 41. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância da altura aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	75
Figura 42. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> submetidas a aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	76
Figura 43. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	76
Figura 44. Média da altura (cm) aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> submetidas a aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	77
Figura 45. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de	

variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	78
Figura 46. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	78
Figura 47. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância da altura aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	78
Figura 48. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> submetidas a aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	79
Figura 49. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	80
Figura 50. Média da altura (cm) aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> submetidas a aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	80
Figura 51. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	82
Figura 52. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	82
Figura 53. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância da altura aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	82
Figura 54. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Hexazinona + Diuron na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de	

cana-de-açúcar no sistema <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	83
Figura 55. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Hexazinona + Diuron na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	83
Figura 56. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Hexazinona + Diuron na análise de variância da altura aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	83
Figura 57. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida 2,4-D na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	84
Figura 58. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida 2,4-D na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	84
Figura 59. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida 2,4-D na análise de variância da altura aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> . Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	85
Figura 60. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> submetidas a aplicação do herbicida 2,4 - D. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	85
Figura 61. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> submetidas a aplicação do herbicida 2,4 - D. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	86
Figura 62. Média da altura (cm) aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições <i>ex vitro</i> submetidas à aplicação do herbicida 2,4 - D. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	86

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Análise de variância da característica notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 DAT, no experimento <i>in vitro</i>	59
Tabela 2. Análise de variância da característica número de perfilhos aos 21 DAT, no experimento <i>in vitro</i>	59
Tabela 3. Análise de variância da característica peso de matéria seca, no experimento <i>in vitro</i>	60
Tabela 4. Análise de variância da característica notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 DAT, no experimento <i>ex vitro</i>	69
Tabela 5. Análise de variância da característica número de perfilhos aos 21 DAT, no experimento <i>ex vitro</i>	70
Tabela 6. Análise de variância da característica altura aos 21 DAT, no experimento <i>ex vitro</i>	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 A cultura da cana-de-açúcar	21
2.2 Variedades	22
2.2.1 RB951541	23
2.2.2 RB966928.....	24
2.2.3 RB98710.....	24
2.2.4 RB969017	25
2.2.5 RB979088.....	25
2.2.6 SP79-1011	25
2.3 Propagação <i>in vitro</i> (Micropropagação).....	26
2.3.1 Estádios da propagação <i>in vitro</i>	28
2.3.2 Estádio 0: seleção da planta-mãe ou matriz.....	29
2.3.3 Estádio 1: retirada do explante e seu estabelecimento em cultura asséptica.....	29
2.3.4 Estádio 2: multiplicação do explante.....	31
2.3.5 Estádio 3: enraizamento.....	31
2.3.6 Estádio 4: aclimação	32
2.3.7 Cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar.....	33
2.4 Herbicidas na cultura da cana-de-açúcar	36
2.4.1 Herbicidas – Mecanismos de ação.....	37
2.4.2 Clomazone	38
2.4.3 Diuron e Hexazinona + Diuron	40
2.4.4 MSMA	41
2.4.5 2,4-D.....	42
2.5 Tolerância à herbicidas	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de variedades e clones de cana-de-açúcar.....	46
3.1.1 Obtenção das plantas matrizes e das fontes de explantes.....	46
3.1.2 Meio de Cultura.....	47
3.1.3 Extração do meristema do ápice caulinar	48
3.1.4 Repicagem	50
3.1.5 Enraizamento	51

3.2 Experimento <i>in vitro</i>	52
3.3 Experimento <i>ex vitro</i>	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Experimento <i>in vitro</i>	56
4.1.1 Tolerância ao Herbicida Clomazone	61
4.1.2 Tolerância ao Herbicida MSMA	64
4.1.3 Tolerância ao Herbicida Diuron	67
4.2 Experimento <i>ex vitro</i>	70
4.2.1 Tolerância ao Herbicida Clomazone	74
4.2.2 Tolerância ao Herbicida MSMA	77
4.2.3 Tolerância ao Herbicida Diuron e Hexazinona + Diuron.....	81
4.2.3 Tolerância ao Herbicida 2,4-D	84
5. CONCLUSÕES.....	88
5.1 Experimento <i>in vitro</i>	88
5.2 Experimento <i>ex vitro</i>	88
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), é uma planta semiperene da família *Poaceae*, (MAGRO et al., 2011), cujo desenvolvimento ocorrem em forma de touceira, sendo a parte aérea formada por colmos, folhas e inflorescências, enquanto a subterrânea é constituída por raízes e rizomas (CESNIK & MIOCQUE, 2004). É uma espécie originária do Sudeste Asiático, sendo que as primeiras mudas foram introduzidas no Brasil em 1532 por Martim Afonso de Souza provenientes da Ilha da Madeira, impulsionando a formação dos primeiros engenhos açucareiros no Brasil (LANDELL et al., 2006).

Atualmente, é uma das culturas de maior importância econômica para o Brasil, por consequência da grande produção alcançada nos últimos anos, produzindo matéria-prima para a indústria sucroalcooleira e também na cogeração de energia elétrica, sendo produzidas segundo a FAO (2010) cerca de 600 milhões de toneladas no Brasil, colocando o País no topo do ranking mundial de produção de cana-de-açúcar. A importância desse setor na sociedade brasileira é demonstrada pelas exportações de açúcar que colaboram com o equilíbrio da balança comercial e pelo grande potencial na geração de empregos diretos e indiretos, por exemplo, de acordo com INDA (2012), em 2011 as usinas de açúcar e álcool foram responsáveis pela maior parte dos empregos gerados no estado de São Paulo.

Apesar da cana-de-açúcar ser uma planta de metabolismo fotossintético C₄, considerada altamente eficiente na conversão de energia radiante em energia química, com taxas fotossintéticas calculadas em até 100 mg de CO₂ fixado por dm² de área foliar por hora (RODRIGUES, 1995), deve-se evitar que ela sofra os efeitos da competição com plantas daninhas no período que vai do plantio até os primeiros 60 DAP (dias após o plantio), principalmente por apresentar brotação e crescimento iniciais lentos e ser cultivada com largos espaçamentos entre linhas (KUVA, 2003; PROCÓPIO, 2003).

Um dos principais problemas enfrentados pela cultura da cana-de-açúcar segundo VICTORIA FILHO & CHRISTOFFOLETI (2004), é a concorrência com plantas infestantes, que provoca perdas sérias na produtividade, que podem atingir até 85 %, quando não controladas adequadamente.

A cana-de-açúcar é a segunda cultura em consumo de herbicidas no Brasil, atrás apenas da soja (SINDAG, 2008). A incidência de plantas invasoras pode reduzir a produtividade da cultura, pois competem pelos recursos limitantes do meio, como água, luz e nutrientes, além de liberarem substâncias alelopáticas e hospedarem pragas e doenças

(PITELLI, 1985). Dependendo da infestação, o custo do controle das plantas daninhas pode chegar a 30% do custo de produção em cana-soca e até 25% em cana planta (LORENZI, 1995).

Os herbicidas podem exercer efeitos diretos e indiretos no crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas (DAS et al., 2003; RIZZARDI, 2003). Podem ser observadas alterações na absorção de nutrientes, sintomas de intoxicação e desregulação dos mecanismos de defesa da cultura a determinados fatores abióticos ou bióticos, que não são perceptíveis e nem amplamente considerados (RIZZARDI, 2003), sendo relatados somente em poucos artigos científicos (FENG, 2005; TUFFI SANTOS, 2007).

Estudos com herbicidas de ação localizada indicam que a cana-de-açúcar pode tolerar até 27% de comprometimento da área foliar sem que isso implique redução da produtividade (VELINI, 1993). Entretanto, para herbicidas sistêmicos esse valor pode ser diferenciado, dependendo do processo fisiológico afetado pelo produto (GALON, 2008).

Na atualidade os programas de melhoramento genético estão liberando cultivares de cana-de-açúcar cada vez mais produtivas e com maior resistência às doenças e pragas. Entretanto, são poucos os trabalhos desenvolvidos com os cultivares mais modernos, em relação à tolerância a herbicidas (TERUEL et al., 1997; OLIVEIRA, 2004; FERREIRA, 2005).

Visando obter resultados rápidos para detecção da tolerância das variedades à aplicação de herbicidas, primeiramente deve-se diminuir o tempo de obtenção das mudas, para isso, a técnica biotecnológica de micropropagação da cana-de-açúcar, se adéqua aos anseios de uma propagação vegetativa em curto espaço de tempo, em grande escala e em espaço reduzido.

A biofabricação de plantas é hoje uma realidade bastante comum na agroindústria de cana-de-açúcar para a produção industrial. Este é um processo tecnológico já consagrado, com resultados comprovados quanto à uniformidade e qualidade, além da vantagem da velocidade de produção ser muito superior quando comparada a dos processos convencionais (GERALD, 2011).

A técnica de propagação desta espécie por meio de meristema apical é considerada uma alternativa vantajosa para a multiplicação de diversas cultivares, devido à economia de tempo em relação às técnicas convencionais, além da obtenção de mudas de excelente qualidade fitossanitária e geneticamente idênticas ao material de origem (VIEIRA et al., 2009).

A adoção do método químico para o controle de plantas daninhas na cana-de-açúcar demanda mais estudos sobre a tolerância da cultivar em função do herbicida e das doses aplicadas, pois estes fatores podem influenciar as características morfofisiológicas da cultura, produtividade e as alterações na qualidade biológica do produto colhido (GALON, 2008).

Assim sendo, a proposta é fornecer novas metodologias para a diferenciação precoce da tolerância de variedades e clones de cana-de-açúcar, utilizando plantas micropropagadas, na fase *in vitro* e *ex vitro*, submetidas ao tratamento com herbicidas em doses distintas, almejando com isso, verificar futuros estresses causados pela aplicação dos herbicidas sobre a cultura da cana-de-açúcar.

Portanto, objetivou-se avaliar a tolerância das variedades e clones de cana-de-açúcar: RB951541, RB966928, RB98710, RB969017, RB979088 e SP79-1011, aos herbicidas: clomazone, diuron, hexazinona + diuron, MSMA e 2,4-D, utilizando a técnica da micropropagação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, mérito de suas múltiplas utilidades, pode ser empregada *in natura*, sob a forma de forragem para a alimentação animal, como matéria prima para a fabricação de açúcar, álcool e aguardente, até mesmo seus resíduos tem uma grande importância econômica, como o vinhoto que é transformado em adubo e o bagaço em energia (USP, 2007).

Fisiologicamente, a cana-de-açúcar apresenta um metabolismo C4 que possui a característica de alta eficiência na conversão de energia solar em energia química, com taxas fotossintéticas calculadas em até 100 mg de CO₂ fixado por dm² de área foliar por hora. A cultura possui um ciclo longo, o que resulta em alta produção de matéria seca, é cultivável numa ampla faixa de latitude, desde cerca de 35°N a 30°S e em altitudes que variam desde o nível do mar até 1.000 metros. A temperatura é um dos fatores climáticos importantes para a produção. A cultura geralmente é tolerante a altas temperaturas, produzindo em regiões com temperatura média de verão de 47° C, desde que empregada irrigação. Temperaturas mais baixas (menos de 21° C), diminuem o crescimento dos colmos e promovem o acúmulo de sacarose. O fotoperíodo também é importante, afetando o comprimento do colmo: em fotoperíodos de 10 a 14 horas o colmo aumenta, no entanto sofre redução em fotoperíodos longos, entre 16 e 18 horas (RODRIGUES, 1995).

As espécies que originaram as cultivares atuais de cana-de-açúcar foram oriundas do sudoeste asiático (LPFD, 2013). Planta semi-perene, monocotiledônea, pertencente a família das *Poaceas*, gênero *Saccharum officinarum* (RIBEIRO, 2006). Sua cultura se estabeleceu no Brasil, no período colonial, nas décadas de 1530 e 1540; a renda das exportações do açúcar sempre ocupou o primeiro lugar, mesmo no auge da exportação do ouro, o açúcar continuou a ser o produto mais importante (FAUSTO, 1996).

Atualmente, a lavoura de cana-de-açúcar, está em expansão no Brasil. A área cultivada que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 está estimada em 8.520,5 mil hectares, o estado de São Paulo é o maior produtor com 4.419,46 mil hectares, seguido por Goiás com 725,91 mil hectares, Minas Gerais com 721,86 mil hectares, Paraná 610,83 mil hectares, Mato Grosso do Sul 542,70 mil hectares, Alagoas 445,74 mil hectares e Pernambuco com 327,61 mil hectares, já os demais estados apresentam um percentual menor que 3% da área cultivada, como o Rio de Janeiro, que possui 45,110 mil hectares, sendo um

aumento de 3,8 mil hectares comparado à última safra de 2011/12. Em relação ao levantamento da produtividade, a média brasileira está estimada em 69.846 kg/ha, 4,2% maior que na safra 2011/12. A previsão da produção de açúcar na safra 2012/13 é de 37,66 milhões de toneladas, 4,72% a mais que na última safra, já a produção de etanol, estima-se 23,62 bilhões de litros, 5,22% menor que a produção de 2011/2012 (CONAB, 2012).

Segundo BARBOSA & SILVEIRA (2006), o cultivo da cana-de-açúcar é considerado uma das primeiras atividades de importância nacional, ocupando posição de destaque na economia brasileira. A produção de açúcar, álcool e aguardente, são atividades que se apresentam com grande relevância na geração de divisas.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de açúcar, com cerca de 600 milhões de toneladas, seguido da Índia, China e Tailândia, de acordo com a FAO (2010), ocupando papel de liderança no setor global de biocombustíveis. Assim, percebe-se que o setor sucroalcooleiro é bastante promissor para o País, sendo esta indústria uma das que mais colabora com o dinamismo da economia nacional. Em 2011, as usinas de açúcar e álcool foram responsáveis pela maior parte dos empregos gerados no estado de São Paulo (INDA, 2012).

O melhoramento genético é considerado um dos fatores agronômicos que podem contribuir com o aumento da produtividade, permitindo desenvolver cultivares que se adaptem melhor às condições adversas de solo e clima e à incidência de pragas e doenças, assim como ao sistema de colheita. A máxima produtividade depende também de um correto planejamento de plantio e de adequado manejo das cultivares, as quais devem atender a exigências tanto do campo como da indústria (MARIN, 2007).

MOLINARI (2012) ressalta que os programas de melhoramento genético convencional têm oferecido aos produtores cultivares altamente produtivas ao longo dos anos; entretanto, saltos tecnológicos precisam ser incorporados para alavancar o setor sucroalcooleiro energético, dentre estas tecnologias, a transgenia pode auxiliar como uma ferramenta poderosa que viabiliza a melhoria de características importantes ao produtor, como resistência a pragas e doenças, aumento em biomassa e açúcar, além de características de interesse industrial, como maior teor de açúcar e fibras, também podem ser melhoradas.

2.2 Variedades

De acordo com a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento Sucroalcooleiro – RIDESA (2010), a adoção da tecnologia de novas variedades tem contribuído decisivamente

para o avanço sustentável do setor, pois ao considerar o ganho de produtividade que ocorreu com a cana-de-açúcar nos últimos 40 anos, verifica-se aumento em mais de 30% na produtividade média e também evolução significativa na qualidade da matéria-prima. Neste sentido, a liberação de novas variedades disponíveis no mercado, aliada ao manejo adequado, pode contribuir para elevação da produtividade com menores custos de produção.

A estratégia para a obtenção de novas cultivares baseia-se em cruzamentos de indivíduos geneticamente superiores, que são realizados visando à seleção de genótipos que apresentem características vantajosas em produtividade agroindustrial e tolerância aos principais estresses – pragas, doenças, seca, geada e salinidade (RIDESA, 2010).

No sistema produtivo da cana-de-açúcar, o cultivo de cultivares com boas características agroindustriais é a forma mais consistente de se obter melhorias da produtividade e qualidade, com baixo custo. A introdução de cultivares na lavoura canavieira do Brasil era feita exclusivamente através da importação, até surgirem programas autóctones de melhoramento genético, método mais eficiente de seleção, pois tem-se cultivares apropriadas para os ambientes de cultivo da região, por meio de cruzamentos genéticos, e anos de pesquisa com seleção, experimentação e testes apropriados (BARBOSA et al., 2003).

A existência de muitas cultivares é uma vantagem, embora isto torne difícil a tomada de decisão, já que requer muito mais conhecimento do produtor rural acerca das opções disponíveis. É importante que o produtor possua uma diversidade de cultivares de cana-de-açúcar na lavoura, pois assim pode diminuir a possibilidade de que uma praga ou doença se proliferar dentro do canavial, causando prejuízos (MARIN, 2007).

2.2.1 RB951541

Obtida através do cruzamento das cultivares RB72454 e SP79-1011, a RB951541, possui como aspectos morfológicos, rápido desenvolvimento; colmo manchado, com pouca cera, de cor roxo amarelo ao sol e amarelo roxo sob a palha; entrenós de comprimento curto e diâmetro médio; gemas pouco salientes; folhas com pontas curvas, de largura média e ausência de joçal. Como principais características agrícolas, expressa um bom fechamento de entrelinha, fácil despalha, precocidade em maturação, alto teor de sacarose, alta longevidade do canavial, e resistência a ferrugem marrom e escaldadura (RIDESA, 2010).

Conforme ROSÁRIO (2011), esta cultivar lançada no início de 2010, já demonstrou resultados com rendimentos maiores que 20% da cultivar mais utilizada para início de safra em Alagoas. A RB951541 tem dado resultado em encosta, área de várzea e até área de

sequeiro, onde não há irrigação, além de ter apresentado baixo florescimento, alta produção de açúcar e longevidade, que significa diminuição de custos, já que sendo multiplicada em cinco a seis safras a RB951541 mantém a alta produtividade, ao contrário de outras cultivares que perdem a força a cada safra.

2.2.2 RB966928

A variedade RB966928 foi lançada em 2010 pela RIDESA, adquirida através do cruzamento da RB855156 e RB815690, apresenta rápido crescimento, excelente germinação em cana-planta, brotação em soqueiras muito boa, alto perfilhamento em cana-planta e em cana-soca, com excelente fechamento de entrelinhas, pouco joçal, alta produção agrícola, maturação precoce a média, raro florescimento, fácil despalha, médio teor de sacarose e de fibra (RIDESA, 2010). Possui elevada sanidade às principais doenças: tolerância a ferrugem, carvão, escaldadura, estria vermelha, falsa estria vermelha, raquitismo, mosaico e complexo broca podridões, além de possuir uma média tolerância a herbicida (UFV, 2011). É recomendado o plantio em regiões de média a alta fertilidade (DAROS, 2010).

Segundo o trabalho de AUGUSTO (2009) a RB966928 possui uma ampla adaptabilidade, alta estabilidade fenotípica e elevada produção para a característica açúcar por unidade de área, mensurado em Toneladas de pol por hectare, podendo ser indicado como o genótipo mais promissor para o cultivo na região nordeste do estado do Paraná.

2.2.3 RB98710

A RB98710 é uma das variedades liberadas em 2010 pela RIDESA. Apresentando alto desempenho agrícola e excelente comportamento industrial, a variedade se destaca no estado de Alagoas, e é indicada para o início da safra. As suas principais características são a maturação precoce, o alto teor de açúcar, baixo índice de florescimento e boa produtividade agrícola (PMGCA, 2010).

De acordo com a RIDESA (2011) algumas importantes características dessa variedade, obtida pelo cruzamento da SP813250 e RB93509, são: maturidade precoce, perfilhamento elevado, raro florescimento, boa longevidade, alta produção de açúcar apresentando elevadas Toneladas de pol por hectare e plantio indicado para ambientes com solo fértil e irrigado. Morfologicamente, possui colmo de aspecto manchado, com ausência de cera, cor roxo

amarelo ao sol e amarelo roxo sob a palha, entrenós de comprimento curto e diâmetro médio; gemas pequenas e pouco salientes; joçal regular; folhas estreitas e arqueadas RIDESA (2010).

ROSÁRIO (2010) afirmou que a aptidão da RB98710 em expressar um baixo índice de florescimento, representa uma característica importante, já que o florescimento representa perdas por reduzir bastante o teor de sacarose da cana-de-açúcar, ademais a variedade apresenta um aumento do volume de cana por metro linear.

2.2.4 RB969017

O clone RB969017 está em fase final de seleção pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para futuro lançamento como variedade. Tem como principais características a alta produtividade agrícola, maturação precoce-média e alto teor de açúcar, boa brotação de soqueira e alto perfilhamento.

2.2.5 RB979088

O clone RB979088 está em fase final de seleção pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para futuro lançamento como variedade. Tem como principais características a alta produtividade agrícola, maturação média e alto teor de açúcar.

2.2.6 SP79-1011

As variedades de cana-de-açúcar com a sigla SP, de acordo com o censo varietal de 2011, representam 32,4% da área plantada e cultivada no Brasil, já as variedades RB correspondem a 58,9% da área. Nesta mesma safra, a SP79-1011 ficou em quinto lugar, com 4,4% de área plantada e cultivada no Brasil, o primeiro lugar, RB867515, ficou com 22,1% (CONAB, 2011).

A SP79-1011 expressa uma maturação média/tardia, com excelentes características de produtividade agrícola e industrial, como um alto teor de sacarose, baixo teor de fibra, raro florescimento, boa brotação da soqueira e bom perfilhamento (FERNANDES, 2005).

Em relação às suas restrições, nota-se suscetibilidade à ferrugem e à broca, além de possuir mal fechamento nas entrelinhas e quebra de ponteiros com ventos fortes (IDEA, 2004).

Conforme a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG (2010), as particularidades da SP79-1011 são: medianas exigências em fertilidade do solo, despalha natural, presença de pêlos, colheita de junho a setembro e tolerância intermediária ao carvão.

2.3 Propagação *in vitro* (Micropropagação)

Cultura de tecidos, ou micropropagação, ou ainda, cultura *in vitro* de plantas, é a metodologia de propagação vegetativa em que se usa um meio de cultura suplementado com fitorreguladores, um agente geleificante, ambiente asséptico e condições adequadas de luz e temperatura, para promover a multiplicação somática de pequenos pedaços de tecidos de plantas, induzindo a sua diferenciação, a fim de obter uma planta completa com todos os tecidos e órgãos que lhe são característicos e todas suas funções orgânicas, dentro de recipientes fechados, em laboratório (FEVEIRO et al., 2001).

O termo micropropagação, utilizado primeiramente por Hartman e Kester em 1975, passou a ser empregado para definir os processos de propagação vegetativa na cultura de tecidos vegetais. A definição de micropropagação para os autores GUERRA & NODARI (2006) é uma propagação clonal massal de um genótipo selecionado por técnicas de cultura *in vitro*. Esta técnica apresenta diversas vantagens, como a multiplicação de grandes quantidades de plantas em espaço físico e tempo reduzidos, e a possibilidade de realizar limpeza clonal, gerando indivíduos livres de patógenos (COSTA, 2012).

De acordo com TEIXEIRA (2002), a micropropagação é uma forma vegetativa de propagação de diferentes espécies de plantas por meio da técnica denominada cultura de tecidos. Essa metodologia requer laboratórios bem estruturados e técnicos especializados.

Segundo o conceito de CID (2001), a propagação *in vitro* de plantas, chamada também micropropagação, é uma técnica para propagar plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro, sob adequadas condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂.

Para ZAVATTIERI (2002) a micropropagação é a propagação fiel de um genótipo selecionado por meio das técnicas do cultivo *in vitro*. Geralmente a micropropagação é também associada com a produção em grande escala a preços competitivos.

A propagação vegetativa *in vitro* na concepção de CARVALHO & VEIGA (2011) é a formação e multiplicação de indivíduos geneticamente idênticos obtidos a partir de células e tecidos extraídos de uma planta matriz, na agricultura o seu uso é preferencialmente para produção de plantas (espécies de propagação vegetativa) em grande escala, em curto espaço

de tempo e ocupando área física bastante reduzida; e para lançamento de novas variedades (multiplicação rápida de genótipos selecionados – novas variedades). As plantas obtidas por esse tipo de propagação apresentam elevado padrão fitotécnico: padronização das mudas, maior facilidade de manejo e tratos culturais, padronização da lavoura e do produto final, maior valor de mercado e qualidade fitossanitária: plantas mais vigorosas e sadias.

Vários métodos de cultura de tecidos, utilizando partes diversas das plantas, foram desenvolvidos com diferentes objetivos. Entre os principais métodos de cultura de tecidos estão a cultura meristemática, a microenxertia, a cultura de embriões, a cultura de calos, a suspensão celular, a polinização e fertilização *in vitro*, a cultura de ovários, a cultura de protoplastos e a embriogênese somática. Os principais usos da cultura de tecidos são a reprodução de plantas *in vitro* para produção de mudas, a recuperação de plantas isentas de vírus (limpeza clonal), a conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), a obtenção de mutantes *in vitro*, a produção de haplóides e duplos haplóides e a produção de plantas transgênicas. (TORRES et al., 1998).

O fundamento da prática de micropropagação *in vitro* é baseado na teoria da totipotência celular. A Totipotencialidade é o princípio biológico creditado ao fisiologista vegetal alemão Haberlandt, que em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para reproduzir um organismo inteiro. Como corolário, este fisiologista elaborou previsões de que tecidos, células e órgãos poderiam ser mantidas indefinidamente em cultura. De certa forma o conceito de totipotencialidade já era inerente à teoria celular de Schleiden e Schwann, 1838, ao postularem que algumas células eram capazes de serem separadas do organismo e continuar a crescer (GUERRA & NODARI, 2006).

Esta teoria formulada por Matthias Schleiden & Theodor Schwann, em 1838, pode ser dita como constituinte dos primeiros fundamentos da cultura *in vitro*, embora seus formuladores nem tenham imaginado uma metodologia como essa. A teoria afirma que a célula é autônoma, portanto, que contém o potencial necessário para originar um organismo completo; ou seja, uma planta completa, contudo, essa capacidade deve manifestar-se sob especiais condições de estímulo. O fisiólogo vegetal Haberlandt, imbuído dessa teoria, foi o primeiro a manipular um sistema de cultura *in vitro* de plantas, procurando estabelecer e consolidar um sistema de micropropagação. Infelizmente, por limitações técnicas da época, seus esforços falharam, o que se atribui a não haver usado fitormônios no meio nutritivo, utilização de espécies inadequadas, baixa densidade de inóculo e uso de explantes de tecidos maduros. Contudo, alguns anos mais tarde a partir dos trabalhos de Robbin, 1922, e White, 1934, em ponta de raízes; cultura de embriões, por La Rue, 1936; cultura de calos, por

Gautheret Nobécourt, 1939; enriquecimento de meios nutritivos com leite de coco, por van Overbeek, 1941; uso de plantas de tabaco como modelo experimental para estudo de morfogênese, por Skoog, desde 1944, e uso de meristemas apicais na obtenção de plantas livres de vírus, por Morel & Martin, 1952, abriram-se as estradas que a cultura de tecido de plantas percorreria triunfalmente ao longo de todo o século XX, com mais e mais descobertas e aplicações (CID, 2001).

A cultura de tecidos, dentro do campo da biologia de plantas talvez seja uma das técnicas mais polivalentes. Assim, através da cultura de protoplastos, pode-se hibridizar cultivares diferentes, vencendo barreiras genéticas; através da cultura de anteras, pode-se obter plantas haplóides, que logo depois pode-se diploidizar e transformar-se em homozigotos, isto é, indivíduos que produzem um só tipo de gameta para um determinado locus; com a cultura de células em meio líquido, pode-se obter mutantes, isto é, genótipos que ganharam ou perderam alguma característica específica; com a cultura de embriões e meristemas, pode-se fazer trabalhos de criopreservação para conservar materiais em bancos de germoplasmas, com economia de espaço e dinheiro, especialmente em espécies de reprodução assexuada como batata, mandioca, abacaxi etc.; com a cultura de meristemas apicais, pode-se pensar em obter plantas livres de vírus; e com a cultura de gemas axilares, propagar milhares de plantas, com genótipos superiores, por exemplo resistentes a nematóides, *Fusarium* etc.; na mesma linha de raciocínio, a embriogênese somática, pode fornecer grandes quantidades de plântulas que podem servir de base para plantios no campo, tanto na área florestal quanto na agrônômica e na hortigranjeira. A cultura de tecidos também dá suporte técnico a trabalhos de transformação na área da genética e na obtenção de plantas transgênicas. Apesar de toda essa diversidade de técnicas, a cultura de tecido é uma só, e o denominador comum de todas elas é: a assepsia, o explante, o meio nutritivo e os fatores ambientais: luz, temperatura, CO₂ e O₂ (CID, 2001).

A cultura de tecidos no Brasil é uma realidade não apenas em muitos laboratórios acadêmicos, senão também em empresas privadas, bem articuladas comercialmente e relacionadas com culturas de importância econômica, tais como: cana-de-açúcar, flores, eucaliptos e pinheiros (CID, 2010).

2.3.1 Estádios da propagação *in vitro*

A metodologia da micropropagação tem como princípios básicos, a obtenção do explante, a assepsia, meio nutritivo e as condições ambientais de cultivo. Murashige em 1974

elaborou os estádios da propagação vegetativa *in vitro*, sendo eles: estágio 1: retirada do explante e seu estabelecimento em cultura asséptica; estágio 2: multiplicação do explante (formação de brotações ou de embriões); estágio 3: formação de novas plantas (enraizamento); estágio 4: aclimação das novas plantas (cultivo *ex vitro* em ambiente controlado) e por final, transferência para as condições naturais de cultivo (CARVALHO & VEIGA, 2011). Debergh e Read em 1991, propuseram a inclusão do estágio 0: seleção da planta-mãe ou matriz; na sequência de operações de Murashige 1974 (GUERRA & NODARI, 2006).

2.3.2 Estádio 0: seleção da planta-mãe ou matriz

Este estágio foi originalmente concebido para melhorar as condições higiênicas das plantas mãe (ZAVATTIERI, 2002). A fase 0, consiste em selecionar e cultivar a planta matriz doadora de explantes em condições adequadas e, eventualmente, controladas. Isto significa que pode ser necessário modificar as condições de fotoperíodo e temperatura, ou aplicar a essa planta fitorreguladores do grupo das giberelinas e auxinas, alterando com isto a sua condição fisiológica. (GUERRA & NODARI, 2006), o crescimento, a morfogênese e as taxas de crescimento e propagação da cultura dependerão do tratamento prévio da planta mãe. (ZAVATTIERI, 2002). É importante que a planta doadora de explantes seja jovem fisiologicamente, possua qualidade genética e fitossanitária (CARVALHO & VEIGA 2011).

2.3.3 Estádio 1: retirada do explante e seu estabelecimento em cultura asséptica

Dentro da terminologia da cultura de tecidos, em geral, explante é qualquer segmento de tecido oriundo de uma planta para iniciar uma cultura *in vitro*. Assim, o explante pode ser um ápice radicular ou caulinar, uma gema axilar, um segmento de folha jovem, uma antera, um ovário, um embrião zigótico, etc. (CID, 2001). O objetivo deste estágio é a definição do tipo de explante a ser utilizado, a desinfestação do explante para o estabelecimento de culturas assépticas, isentas de microorganismos contaminantes e a obtenção de altos índices de sobrevivência e de rápido crescimento dos explantes (CARVALHO & VEIGA, 2011). Neste estágio torna-se necessário monitorar e controlar as reações de oxidação de compostos fenólicos presentes no explante, como resposta ao ferimento provocado pela excisão de um órgão ou tecido e; pela síntese de compostos mono e poliméricos por parte do explante. A

incubação das culturas na ausência da luz por alguns dias pode inibir os processos oxidativos (GUERRA & NODARI, 2006).

Para CARVALHO & VEIGA (2011), explante é a parte retirada da planta para iniciar o cultivo *in vitro*, um dos fatores a serem considerados na escolha do explante é o que se refere à resposta morfogênica: tecidos meristemáticos se desenvolvem mais rapidamente e são mais estáveis geneticamente. A morfogênese é uma consequência dos processos de divisão e diferenciação celular integrados. Tais processos dependem de sinais fitormonais e luminosos que agindo direta ou indiretamente ao nível gênico desencadeiam processos específicos de síntese, e como consequência, alterações bioquímicas e metabólicas diversas. Ou seja, a morfogênese é uma integração entre crescimento (mudanças quantitativas) e diferenciação (alterações qualitativas), sendo um resultado de um complexo controle hormonal múltiplo, espacial e temporal, através da regulação e expressão de sistemas gênicos múltiplos (GUERRA & NODARI, 2006). O nível de diferenciação do explante e a fase de desenvolvimento em que se encontra o tecido são elementos significativos no processo de tomada de decisão para a escolha do explante. Os tecidos menos diferenciados tem maior probabilidade de resposta morfogênica *in vitro* (CARVALHO & VEIGA, 2011).

A possibilidade de manipulação da morfogênese relaciona-se com a exata compreensão dos conceitos enunciados anteriormente, desta forma, tecidos, órgãos ou células com intensidades variadas de determinação podem adquirir novas competências através da ação de determinados sinais químicos (reguladores de crescimento) que ativam seletivamente determinados genes (epigênese), a resposta final é a expressão morfogenética em dois níveis básicos: organogênese ou embriogênese somática (GUERRA & NODARI, 2006).

Quanto à fonte de explante, normalmente haverá maior sucesso se forem utilizados tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogenética. Explantes que contém tecidos meristemáticos são preferidos, sendo encontrados em gemas caulinares apicais e axilares (LERCARI et al., 1999).

Nesta etapa também há uma preocupação com a contaminação do material, por isso técnicas para manter a assepsia do ambiente são imprescindíveis para o sucesso do cultivo. A assepsia é um conjunto de procedimentos empregado para tornar um explante livre de microrganismos (bactérias, fungos filamentosos, leveduras etc). Para evitar microrganismos que possam contaminar o explante é inevitável o uso de antissépticos, sejam estes bacteriostáticos ou germinicidas, esses antissépticos podem ser antibióticos ou de outra natureza, como álcoois (álcool etílico); halogênios (hipoclorito de sódio); sais de metais pesados (bicloreto de mercúrio), fungicidas orgânicos etc. Em relação à vidraria e aos meios

de cultura, estes devem ser esterilizados para que se destruam todos os microrganismos, por calor seco (forno, ar quente) ou úmido (autoclave). Pinças bisturis e demais utensílios metálicos para a manipulação do tecido podem ser esterilizados por flambagem direta, como por exemplo: lamparina com álcool ou bico de Bunsen na câmara de fluxo laminar, ambiente este axênico (livre de germes), portanto adequado para o trabalho *in vitro* (CID, 2001).

2.3.4 Estádio 2: multiplicação do explante

O Estádio 2 é a fase de multiplicação que é fundamentada na divisão e diferenciação celular, objetivando a obtenção de uma plântula, de acordo com as diferentes rotas morfogénéticas possíveis. De maneira geral procura-se promover a liberação de gemas axilares pré-formadas ou a indução de gemas adventícias. Em muitos casos estágios intermediários de calo estão envolvidos, contudo, quando o objetivo é a manutenção da conformidade clonal, a passagem por estágios de calo deve ser evitada, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de variações somaclonais. Neste estágio deve-se determinar o número e intervalo de subcultivos, bem como determinar e otimizar a taxa de multiplicação, ou seja, o número de gemas ou de eixos caulinares que podem ser obtidos a partir de cada inóculo nos sub-cultivos. Para bananeira e abacaxizeiro, partindo-se de gemas apicais e laterais respectivamente, a taxa média de multiplicação é de 10 eixos caulinares a cada subcultivo realizado a cada 20 dias. A experiência adquirida com esses dois sistemas indica que podem ser efetuados cinco subcultivos com certa garantia de manutenção de fidelidade clonal. A partir deste daí podem aparecer mutantes ou variantes somaclonais (GUERRA & NODARI, 2006). Para cana-de-açúcar, a taxa de multiplicação do material é de 1:10, podendo ser realizado no máximo 5- 6 subcultivos para não ocorrer perda de vigor e variação somaclonal (CARVALHO & VEIGA, 2011). As condições ambientais neste estágio relacionam-se com a temperatura, cuja faixa ótima está entre 22°C e 27°C para plantas de clima temperado e tropical, respectivamente. O período de luz deve permanecer em torno de 16 a 18 horas em intensidades luminosas médias de 5 W.m⁻² (GUERRA & NODARI, 2006).

2.3.5 Estádio 3: enraizamento

As plântulas derivadas do estágio 2 são sensíveis, não sendo possível a sua transferência direta para o solo ou outro substrato, isso, na fase 3, são seguidos procedimentos

para que as plântulas sejam capazes de sobreviver em condições naturais sem a adição artificial de carboidratos (ZAVATTIERI, 2002).

Nesta etapa busca-se a indução, a iniciação, o alongamento radicular e a preparação para o estágio 4 – aclimatação (TORRES, 1998). As estratégias deste estágio incluem eventuais inclusões no meio de cultura de giberelina para induzir o alongamento de eixos caulinares; auxina para induzir a iniciação radicular e carvão ativado para favorecer a iniciação radicular, pois auxiliam na ação das auxinas e promovem a fixação dos compostos fenólicos produzidos pelo explante. Reduções nas concentrações dos sais e das fontes de carboidratos do meio de cultura podem trazer benefícios à iniciação radicular, bem como facilitar o processo de aclimatação (GUERRA & NODARI, 2006). Outro fator que pode influenciar na indução das raízes é a luminosidade, pois a presença da luz pode ocasionar a redução dos teores endógenos de AIA (ácido indol-3-acético), assim como o acúmulo de fenóis e seus subprodutos que inibem o enraizamento (ASSIS & TEIXEIRA, 1998). Para o cultivo *in vitro*, o balanço da concentração dos hormônios auxinas e citocininas são imprescindíveis para a resposta morfogênética, a alta concentração de auxina e baixo de citocinina, favorece o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea, já concentrações iguais promovem a produção de calos (SKOOG & MILLER, 1957). O tipo do sistema de raízes, obtido no enraizamento *in vitro*, também determina o sucesso do transplante, as raízes formadas *in vitro* têm pouca capacidade de absorção e não respondem imediatamente ao momento do transplante, além de serem pouco funcionais, delicadas e propensas ao ataque de microorganismos (GUERRA & NODARI, 2006), sendo as raízes mais curtas as mais adequadas, uma vez que apresentam-se em fase de crescimento ativo, facilitando a pega da planta (GRATTAPLAGIA & MACHADO, 1990). Tendo em vista que este estágio da cultura *in vitro* pode representar 30 a 60% do custo de uma planta micropropagada, muitos laboratórios preferem promover o enraizamento *ex-vitro* e esta estratégia deve ser considerada sempre que possível (GUERRA & NODARI, 2006).

2.3.6 Estádio 4: aclimatação

Após serem propagadas *in vitro*, as plantas são aclimatizadas antes de irem a campo. Na cultura de tecidos, denomina-se de aclimatação o processo de adaptação das plantas do ambiente *in vitro*, para o *ex vitro* (COSTA, 2012).

Neste estágio ocorre a transição da condição heterotrófica para autotrófica. O principal objetivo neste estágio é diminuir ao máximo as perdas que ocorrem principalmente pela desidratação dos tecidos da microplanta (GUERRA & NODARI, 2006).

Durante o cultivo *in vitro*, as plantas se desenvolvem em condições de baixa luminosidade, alta umidade e com uma fonte de carbono no meio de cultura. Esses fatores contribuem para o desenvolvimento de um fenótipo que não sobrevive às condições ambientais se transferidos diretamente para o campo. Portanto, as características fisiológicas e anatômicas das plantas micropropagadas, necessitam ser gradualmente aclimatizadas ao ambiente *ex vitro* (HAZARIKA, 2003).

O processo de aclimação de plantas cultivadas *in vitro* é um passo crítico para muitas espécies, requerendo tempo e demandando custos, fatos que podem restringir a aplicação comercial da técnica de micropropagação (FILA et al., 1998). O emprego de estufas, túneis plásticos, sistemas de nebulização e de antitranspirantes deve ser considerado para cada situação, tendo em vista que as plantas neste estágio normalmente não apresentam estômatos funcionais e suas folhas tem reduzida capacidade de formar cutículas cerosas protetoras. Composições adequadas de substratos também são importantes e na maior parte dos casos o emprego de areia, terra, vermiculita, casca de arroz carbonizada isoladamente ou em misturas proporcionais, resulta em elevados índices de sobrevivência (GUERRA & NODARI, 2006).

A taxa fotossintética *in vitro* é um dos principais fatores que influenciam nos baixos percentuais de aclimação, provavelmente devido ao baixo fluxo fotossintético de fótons e à baixa concentração de CO₂ encontrada nos frascos de cultivo fechados (SEON et al., 2000). Essa baixa atividade fotossintética *in vitro* faz com que seja necessário um suprimento de carboidratos durante o cultivo, reduzindo ainda mais a atividade de enzimas do sistema fotossintético (COSTA, 2012).

2.3.7 Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar

Já foi provado que mais de 1.000 espécies de plantas podem ser micropropagadas, dentre elas, as plantas ornamentais são as mais biofabricadas no mundo inteiro, dependendo da região, as plantas frutíferas também são produzidas com bastante frequência através desta tecnologia, culturas extensivas raramente são produzidas por este método, com exceção da cana-de-açúcar. Na Ásia, desde 1991, a cana-de-açúcar já é a 3^a planta mais biofabricada, com uma produção anual de 8 milhões de unidades. Países como Cuba, Estados Unidos e Brasil também têm biofábricas de cana-de-açúcar (GERALD, 2011).

A cana-de-açúcar é usada na produção de 65% do açúcar mundial, e também é matéria-prima para a produção de álcool, produtos farmacêuticos e outros compostos. Em decorrência da posição de destaque que ocupa na economia mundial, a cultura da cana está frequentemente inserida em programas de melhoramento de espécies cultivadas, visando à introdução de características de interesse agrônomo, como resistência a pragas e patógenos, tolerância a herbicidas, e aumento no teor de sacarose (CIDADE et al., 2006).

Como visto anteriormente, a propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, é a aplicação mais prática e de maior impacto da cultura de tecidos, que tem como principal objetivo a limpeza clonal ou a aceleração dos métodos convencionais de propagação vegetativa (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Para a cana-de-açúcar, a propagação *in vitro* é bastante vantajosa, considerando que um dos maiores problemas enfrentados em programas de melhoramento genético convencional nessa cultura é a dificuldade de multiplicar o material selecionado com rapidez. Normalmente, antes da utilização da micropropagação, além dos 10 ou 15 anos de seleção, eram requeridos mais alguns anos para se estabelecer as novas cultivares em plantios comerciais (DONATO et al., 2005).

A micropropagação é uma alternativa ao processo convencional de propagação vegetativa por meio de colmos. Altas taxas de multiplicação de cana-de-açúcar podem ser alcançadas por esse método, com inúmeras vantagens em relação à multiplicação em campo, como a produção de grande quantidade de mudas de qualidade superior, em tempo e espaço reduzidos (MALHOTRA, 1995).

A propagação e a manipulação *in vitro* da cana-de-açúcar apresentam grandioso avanço tecnológico nas regiões do planeta em que a cultura está mais desenvolvida, onde biofábricas (LEE et al., 2007) e sistemas automatizados (KAIZU et al., 2002) viabilizaram-se para a geração em larga escala de material propagativo sadio com origem genética assegurada.

Estudos mostram que mudas micropropagadas podem aumentar a produtividade e a longevidade dos canaviais em até 30%, uma vez que possibilita melhor padrão fitossanitário, controle das condições ambientais do processo, produção o ano todo e otimização da área utilizada quando comparada com o método convencional (CRUZ et al., 2009). A produção em larga escala é feita em instalações denominadas biofábricas, que são laboratórios com equipamentos modernos, onde ocorre a utilização de técnicas biotecnológicas, que permitem a produção, *in vitro*, em escala industrial de uma determinada planta, cujo processo produtivo já esteja bem definido (RAPOSSO et al., 2012). As mudas micropropagadas de cana-de-açúcar

produzidas neste sistema podem aumentar a competitividade do produtor. Isto implicaria em aumento na renda do produtor rural, principalmente nas pequenas e médias propriedades. Além disso, a aplicação dessa biotecnologia permitiria obter o aumento na produção, pelo oferecimento em larga escala de uma gama de cultivares adaptadas e pela alta qualidade genética e fisiológica das mudas oferecidas, sem a necessidade de avançar sobre áreas de preservação ambiental (CRUZ et al, 2009).

Existem muitas vantagens na utilização de biofábricas para produção de mudas em larga escala: pode-se produzir grande quantidade de mudas com alta qualidade fitossanitária (mudas livres de doenças fungos, vírus e bactérias), com homogeneidade, conservando ou aprimorando as características genéticas iniciais da planta que lhe deu origem (RAPOSSO et al, 2012), além da possibilidade da programação e agendamento da produção durante todo o ano. A técnica possibilita disseminar rapidamente novas cultivares com melhores características agrônômicas e econômicas e também permite a pronta substituição de cultivares suscetíveis a uma doença repentinamente epidêmica. O estabelecimento, melhoria no padrão e rendimento da produção, implica em uma maior competitividade do setor produtivo, no caso do sucroalcooleiro, gerando aumento de renda e postos de trabalho no campo e nas cidades (CRUZ et al, 2009).

A cana-de-açúcar é uma excelente planta candidata para emprego como biofábrica. Com sistema de transformação genética relativamente bem estabelecido (BOWER & BIRCH, 1992) e disponibilidade de informações genômicas (CHRISTENSEN & QUAIL, 1996), esta planta ainda possui importantes características como crescimento rápido, acúmulo elevado de biomassa, colmo bem desenvolvido, propagação vegetativa em escala comercial, e florescimento restrito, o que minimiza o risco de dispersão de transgenes. Do ponto de vista socioeconômico, a cultura da cana-de-açúcar passa por um momento bastante favorável, não apenas pelo interesse na produção em larga escala de açúcar e álcool, mas pela versatilidade de matéria-prima, que também é empregada na geração de energia e utilizada como forragem na pecuária (LANDELL et al., 2002).

Sendo assim, a implantação de novas tecnologias que possibilitem um aumento da produtividade e competitividade dos produtores, causa impacto positivo no setor. Dentre as novas tecnologias aplicadas, a bioprodução de mudas utilizando cultura de tecidos, mais precisamente a micropropagação, tem sido utilizada com sucesso para aumentar a produtividade em vários países (JALAJA et al., 2008).

A busca de novas tecnologias é o caminho para promover melhoria de vida dos agricultores. Desse modo, a utilização de ferramentas biotecnológicas para a produção de

mudas de algumas espécies vegetais em larga escala, com alta qualidade sanitária, fidelidade genética, vigor e uniformidade, tem contribuído para o desenvolvimento da agricultura, além de reduzir o impacto negativo em relação ao ambiente, à saúde dos trabalhadores rurais e do consumidor, devido à menor utilização de agrotóxicos (RAPOSSO et al, 2012).

2.4 Herbicidas na cultura da cana-de-açúcar

Ao longo dos anos, a agricultura mundial cresceu em produtividade e área cultivada, acompanhada pelo uso intenso de agrotóxicos, que também sofreram grandes evoluções. Muitas moléculas novas surgiram, com características físico-químicas que propiciam funcionalidades diferenciadas e comportamentos ambientais distintos, com grandes alterações nos perfis toxicológicos e ecotoxicológicos, fruto dos avanços tecnológicos e pressões ambientalistas (ARMAS et al., 2005). O comércio de pesticidas avança cada vez mais, embora muitas mudanças e inovações surjam conforme as necessidades do mercado, entre elas o advento das culturas transgênicas, resistentes a algumas pragas, o uso de herbicidas é destacado visto que a maioria destas inovações não impede o florescimento de plantas daninhas no campo (AMARANTE, 2002).

O controle das plantas daninhas tem progredido desde o arranquio manual das plantas daninhas, que depois passou a ser feito por ferramentas primitivas também manuais, depois por implementos tracionados por animais. A Ciência das Plantas Daninhas e o controle planejado das plantas daninhas começaram depois da segunda Guerra Mundial com a descoberta das propriedades herbicidas do 2,4-D (CHRISTOFFOLETI, 2008).

Nos últimos dez anos, o mercado de agrotóxicos mundial cresceu 93% e o brasileiro cresceu 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Em 2010, o mercado nacional de defensivos, movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de agrotóxicos. Em 2011, houve um aumento de 16,3% das vendas, alcançando US\$ 8,5 bilhões, sendo que as lavouras de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar representam 80% do total das vendas do setor. Nesta safra de 2011, os herbicidas representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados, os fungicidas respondem por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e, as demais categorias de agrotóxicos, 29% (ANVISA, 2012).

Uma das características da cultura da cana-de-açúcar é sua grande capacidade de crescimento, por apresentar fisiologia do tipo C4, porém na maioria das situações, a brotação e crescimento inicial são lentos e a cultura é muito afetada pela competição com as plantas

daninhas (PROCÓPIO, 2003). Em consequência dessa característica, é necessário manter a lavoura de cana-de-açúcar livre de plantas daninhas no período inicial, que varia de 60 a 90 dias (PROCÓPIO, 2003).

Para a EMBRAPA (2004) herbicida é todo o produto utilizado para destruir ou controlar o crescimento de plantas daninhas, arbustos ou outras plantas indesejáveis. Um herbicida se torna seletivo quando há especificidade na sua ação, ou seja, quando aplicado na área de plantio, não afeta de forma danosa a cultura principal, embora controle eficientemente a invasora.

Existem inúmeros herbicidas aplicáveis à cultura da cana-de-açúcar. Com mais de 40 ingredientes ativos, sua recomendação deve ser baseada em aspectos técnicos relacionados com fatores ligados à cultura, às condições edáficas e climáticas e a infestação de plantas daninhas presentes na área (CHRISTOFFOLETI, 2012).

Os herbicidas comumente utilizados para o controle das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar no manejo tradicional são: 2,4 D, acetochlor, ametrina, ametrina + 2,4 D, ametrina + clomazone, ametrina + diuron, clomazone, diuron, diuron + hexazinone, diuron + MSMA, diuron + terbutiuron, glyphosate, metolachlor, metribuzim, halosulfuron, imazapyr, isoxaflutole, oxyfluorfen, sulfentrazone e terbutiuron (BLANCO, 2003).

É fundamental o manejo da planta daninha na cultura da cana-de-açúcar, pois a presença das invasoras pode causar perdas na produtividade de colmos e de açúcar, decréscimo da longevidade do canavial, dificuldade e aumento no custo da colheita, queda na qualidade industrial da matéria prima, servir de abrigo para pragas e doenças da cana-de-açúcar e causar depreciação no valor da terra. Dentre os métodos de controle das plantas daninhas sobressai no Brasil o controle químico, devido, principalmente, ao rendimento operacional e ao custo por área. Vários estudos mostram que os pesticidas podem apresentar toxicidade também a organismos não-alvos (GIOLO et al., 2005; SANTOS et al., 2006).

Até o momento, os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar não avaliam a característica de competitividade dos clones em relação às plantas daninhas e nem sua sensibilidade aos herbicidas. No entanto, fica evidente na prática, que cultivares com intenso e rápido perfilhamento, assim como cultivares que apresentam rápida brotação inicial, são mais competitivas com as plantas daninhas (CHRISTOFFOLETI, 2012).

2.4.1 Herbicidas – Mecanismos de ação

A atividade biológica de um herbicida na planta ocorre de acordo com a absorção, translocação, metabolismo e a sensibilidade da planta ao herbicida e, ou, a seus metabólitos. O simples fato de um herbicida atingir as folhas e, ou, ser aplicado no solo não é suficiente para que ele exerça a sua ação. Para tanto há necessidade de que ele penetre na planta, transloque e atinja a organela onde irá atuar (FERREIRA et al.,2005).

Em princípio herbicidas com mecanismos de ação semelhantes também tendem a falhar contra os mesmos biótipos de plantas resistentes. Isso, contudo, não é uma regra fixa. Pequenas diferenças nos sítios de atuação produzem resultados diferentes, por exemplo, um biótipo resistente a um inibidor de ACCase pode ser menos resistente a outro produto ou ser suscetível a um terceiro (HRAC, 1999).

Também pode haver forte similaridade nos sintomas mostrados pelas plantas entre herbicidas de famílias químicas diferentes, mas que apresentam o mesmo mecanismo de ação (OLIVEIRA et al, 2011).

O primeiro ponto importante a ser esclarecido é a diferença entre mecanismo de ação e modo de ação. Considera-se que o mecanismo de ação diz respeito ao primeiro ponto do metabolismo das plantas onde o herbicida atua. Neste caso, o mecanismo de ação é normalmente o primeiro de uma série de eventos metabólicos que resultam na expressão final do herbicida sobre a planta. O conjunto desses eventos metabólicos, incluindo os sintomas visíveis da ação do herbicida sobre a planta, denomina-se modo de ação. (OLIVEIRA et al, 2011).

2.4.2 Clomazone

O clomazone, 2 - (2 - clorofenil) metil-4,4 - dimetil - 3 - isoxazolidinona, transloca-se na planta via xilema, apresenta atividade de solo e pode persistir, afetando culturas sucessoras. O clomazone apresenta alta solubilidade; assim, quando aplicado sobre a superfície do solo, pode lixiviar e atingir camadas profundas, chegando às raízes das culturas, causando danos naquelas sensíveis. Dessa forma, a dose recomendada varia com o tipo de solo (SILVA et al., 2005). O clomazone é um herbicida pré-emergente, seletivo condicional, de ação sistêmica, recomendado para as culturas de cana-de-açúcar, algodão, arroz, mandioca, pimentão e soja, a concentração do ingrediente ativo é de 500 g/L, é pertencente ao grupo químico isoxazolidinona, com classificação toxicológica Classe II (altamente tóxico) e classificação ambiental Classe II (produto muito perigoso) (FMC, 2011).

Quanto ao seu mecanismo de ação, o clomazone pertence ao Grupo F3- Descoloração: inibição da biossíntese de carotenóides (sítio de ação desconhecido). A ação dos herbicidas pertencentes a este grupo resulta na perda de praticamente todos os pigmentos das plantas suscetíveis, resultando em um sintoma característico de despigmentação ou de albinismo (CHRISTOFFOLETI et al., 2008). Essa folhagem totalmente branca produzida após o tratamento, às vezes é chamado de crescimento albino. O crescimento da planta continua por um certo tempo; contudo, devido à falta de clorofila, ela não consegue se manter. Assim, o crescimento cessa e começam a surgir manchas necróticas. É importante salientar que estes herbicidas não têm efeito sobre carotenóides sintetizados antes da sua aplicação. Desse modo, tecidos formados antes da aplicação do herbicida não se mostram brancos imediatamente, porém, devido à necessidade de renovação dos carotenóides, eles desenvolvem manchas cloróticas que progridem para necrose (ABERNATHY, 1994).

O clomazone inibe a síntese de compostos isoprenóides, que são os precursores de pigmentos fotossintéticos, causando redução no nível de caroteno e fitol e, conseqüentemente, clorofila. O caroteno é um pigmento das plantas responsável, dentre outras funções, pela proteção da clorofila da fotooxidação (BACHIEGA & SOARES, 2002; KRUSE, 2001). Depois da clorofila ser sintetizada e se tornar eletronicamente excitada pela absorção de fótons de luz, é transformada da forma *singlet* para a forma *triplet*, mais reativa. Em condições normais, a energia desta forma reativa de clorofila é dissipada por meio dos carotenóides (CONSTANTIN et al., 2011). Quando os carotenóides não estão presentes esta clorofila no estado *triplet*, não dissipa energia e inicia reações de degradação, nas quais ela é destruída (ABERNATHY, 1994). Portanto, sem a presença dos carotenóides, as clorofilas não são capazes de se manterem funcionais e estáveis (CONSTANTIN et al., 2011). Uma vez que o caroteno reduz o estresse oxidativo (KRUSE, 2001), a inibição da síntese de carotenóides leva à decomposição da clorofila pela luz, resultando na perda da fotoproteção fornecida pelos carotenóides à clorofila (MORELAND, 1980). Devido a este processo, a clorofila não se mantém sem a presença dos carotenóides, que a protegem, dissipando o excesso de energia (SILVA et al., 2005). Com isso, o mecanismo de ação do produto torna-se bidirecional, as folhas ficam descoloridas, por falta de clorofila, morrendo em pouco tempo (TIMOSSI & ALVES, 2001).

O herbicida clomazone é moderadamente persistente no solo, com meia-vida variando de 5 a 29 dias e média de 19 dias, em função do tipo de solo (KIRKSEY et al., 1996). Gallaher & Mueller (1996), em trabalho conduzido por dois anos sob diferentes condições de

ambiente, reportaram vida média de 55 dias para este herbicida. Algumas propriedades da molécula de clomazone são indicativas de que ele apresenta potencial de deslocamento no ambiente por volatilização ou junto à lâmina de água durante a irrigação e drenagem, podendo ocasionar toxicidade às plantas sensíveis. A minimização do efeito de fitotoxicidade sobre organismos não alvos pode ocorrer pela incorporação do herbicida ao solo, diminuindo o potencial de deriva (CONSTANTIN et al., 2011), ou por aplicação do produto em distâncias mínimas consideradas seguras e livres do efeito indesejável (NOLDIN et al., 2001). No solo, o principal fator que determina a sorção é a matéria orgânica, sendo que a influência da textura é secundária e o pH praticamente não influi. A decomposição acontece basicamente pela atividade de microrganismos do solo, com hidrólise e fotólise desempenhando papéis secundários (CONSTANTIN et al., 2011).

2.4.3 Diuron e Hexazinona + Diuron

Os herbicidas atualmente em uso e que apresentam mecanismo de ação de inibição da fotossíntese, atuando no fotossistema II, são pertencentes aos Grupos C1 (triazinas e triazinonas), Grupo C2 (uréias substituídas e amidas) e Grupo C3 (benzotiadiazoles). O local de ação destes herbicidas é na membrana do cloroplasto, onde ocorre a fase luminosa da fotossíntese, mais especificamente no transporte de elétrons (CHRISTOFFOLETI, 1997).

Os herbicidas com ação de contato dos grupos químicos ureia e triazinona, tem mecanismos de ação a inibição da fotossíntese no fotossistema II. O local de ação destes herbicidas é na membrana do cloroplasto, onde ocorre a fase luminosa da fotossíntese, mais especificamente no transporte de elétrons (CHRISTOFFOLETI, 1997).

Em condições normais, sem a interferência de inibidores fotossintéticos durante a fase luminosa da fotossíntese, a energia luminosa capturada pelos pigmentos (clorofila e carotenóides) é transferida para o centro de reação P680, gerando a excitação de um elétron, o qual é transferido para uma molécula de plastoquinona presa a uma membrana do cloroplasto (Qa). A molécula da plastoquinona Qa transfere o elétron, por sua vez, para outra molécula de plastoquinona, chamada Qb. Quando um segundo elétron é transferido para a plastoquinona Qb, a quinona reduzida torna-se protonada, formando uma plastoidroquinona (QbH₂). De maneira simplificada, a função da plastoidroquinona é transferir elétrons entre os fotossistemas II (P680) e o fotossistema I (P700) (FERREIRA et al., 2005).

Os herbicidas diuron e hexazinona + Diuron, derivados da uréia substituída e da triazinona + uréia substituída, se ligam à proteína D-1 no sítio onde se prende a plastoquinona Qb. Esses herbicidas compete com a plastoquinona Qb parcialmente reduzida (QbH) pelo sítio na proteína D-1, ocasionando a saída da plastoquinona e interrompendo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas (FERREIRA et al., 2005). Dessa forma não existe a produção de ATP, pois o transporte de elétrons é interrompido, bem como a produção de NADPH₂ (CHRISTOFFOLETI et al., 2008). A morte das plantas ocorre por outros motivos além da falta de carboidratos, em decorrência da inibição da reação luminosa da fotossíntese. Além da fotoxidação da clorofila, provocando a clorose foliar, ocorrem rompimentos na membrana citoplasmática celular como consequência da peroxidação de lipídios causada pela ação dos radicais tóxicos (clorofila triplet e oxigênio singlet). (FERREIRA et al., 2005)

O diuron possui classificação toxicológica classe III – mediantemente tóxico e classificação do potencial de periculosidade ambiental: classe II muito perigoso ao meio ambiente. É composto por 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia (BRASIL, 2002).

O produto comercial com a mistura dos herbicidas hexazinona + diuron, é um herbicida seletivo para a cultura da cana-de-açúcar, com classificação toxicologica II – altamente tóxico e classificação do potencial de periculosidade ambiental II – muito perigoso ao meio ambiente podendo ser aplicado antes e após a emergência da cultura e das plantas infestantes (BRASIL, 2002).

2.4.4 MSMA

O herbicida MSMA metanoarseniato ácido monossódico, pertence ao grupo químico dos arsenais orgânicos (DURIGAN et al., 2004), é bastante utilizado na cultura do algodão e da cana-de-açúcar no controle de plantas daninhas em pós-emergência tardia, por meio de jato dirigido. Seu mecanismo de ação é de peroxidação dos lipídeos, porém o herbicida é oxidado através da fosforilação oxidativa dos transportadores de elétrons no processo respiratório da planta (CHRISTOFFOLETI et al., 2001). O mecanismo de ação não é bem conhecido, mas provavelmente provoca aumento na concentração dos aminoácidos e/ou utilização acelerada do amido nos órgãos de reserva (DURIGAN et al., 2004). Nas plantas suscetíveis ocorre clorose gradual com desidratação e decomposição das estruturas (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). Apresenta absorção unicamente foliar e translocação restrita, simplástica, quando há concentração de amido nos órgãos de reserva (PROCÓPIO, 2003). Ainda, seu uso é bastante comum em associação com outros herbicidas como diuron, ametrina e tebuthiuron.

As condições climáticas representam um fator fundamental para o bom funcionamento do MSMA, que com temperaturas altas, céu aberto, boa luminosidade e umidade relativa elevada é melhorado significativamente (NIMBAL et al., 1996). Existe apenas um registro de resistência de planta daninha a estes herbicidas, para a planta daninha *Xanthium strumarium*, em algodão, nos EUA. Dessa forma os riscos de seleção de biótipos resistentes nas culturas são pequenos (WEED SCIENCE, 2006).

A classificação toxicológica do produto é III-medianamente tóxico e a classificação do potencial de periculosidade ambiental III-produto perigoso ao meio ambiente (BRASIL, 2008).

2.4.5 2,4-D

A Ciência das Plantas Daninhas e o controle planejado das plantas daninhas começaram depois da segunda Guerra Mundial com a descoberta das propriedades herbicidas do 2,4-D, as sinopses históricas apontam que em 1942, Zimmerman e Hitchcock, nos Estados Unidos, descobriram a propriedade reguladora de crescimento do 2,4-D (CHRISTOFFOLETI, 2011), sendo o primeiro composto orgânico sintetizado pela indústria utilizado como herbicida seletivo (CONSTANTIN et al., 2011). Este herbicida é a base de muitos outros produtos sintetizados em laboratório (2,4-DB; 2,4,5-T, etc.) e marcou o início do controle químico de plantas daninhas em escala comercial. O 2,4-D obteve seu primeiro registro no ano de 1947, nos EUA, chegando ao Brasil na década de 50 para pesquisa e experimentação (SILVA et al., 2005).

Herbicida seletivo de pós-emergência, o 2,4-D, é um dos produtos comerciais que contém em sua formulação o Dimethylammonium (2,4-dichlorophenoxy) acetate (2,4-D AMINA), tendo classificação toxicológica Classe I – extremamente tóxico e classificação do potencial de periculosidade ambiental Classe III – produto perigoso ao meio ambiente. É um herbicida sistêmico, do grupo químico ácido ariloxialcanóico, sendo indicado para as culturas de arroz, cana-de-açúcar, café, milho, soja e trigo (MILENIA, 2008).

Os 2,4-D com formulações aminas são as mais utilizadas no mundo e no Brasil (aproximadamente 95% do total), e dentre estas as mais comuns são as dimetilaminas (SILVA et al., 2005).

Os herbicidas à base de 2,4-D, são utilizados no Brasil a mais de seis décadas, sendo considerado produto-padrão em testes de eficácia biológica de plantas daninhas e de seletividade em diversas culturas, como cana-de-açúcar, milho, trigo, aveia, centeio, arroz e

pastagens. Anualmente são comercializados no mundo cerca de 90 milhões de litros do produto, dos quais 40 milhões nos EUA e 20 milhões na América Latina (CORRÊA, 2010).

O 2,4-D pertence ao Grupo O de herbicidas também conhecido por reguladores de crescimento, auxinas sintéticas ou herbicidas hormonais, em função da similaridade estrutural com a auxina natural das plantas (CONSTANTIN et al., 2011).

As auxinas sintéticas, como o produto químico 2,4-D, são bastante eficientes, pois não são metabolizadas pela planta tão rapidamente quanto o AIA (ácido indol-3-acético) (TAIZ & ZEIGER, 2004). A absorção do herbicida ocorre eficientemente e se faz tanto pelas folhas como pelas raízes, sendo mais rápida para as formulações ésteres que aminas. Uma vez absorvido, o ácido do 2,4-D move-se no interior da planta pelo xilema e floema. O herbicida é distribuído na planta para os meristemas (ponto de crescimento) e outras partes do seu desenvolvimento (ATANOR et al., 2010).

Os herbicidas auxínicos, em plantas sensíveis, induzem mudanças metabólicas e bioquímicas. O metabolismo de ácidos nucleicos e os aspectos metabólicos da plasticidade da parede celular são seriamente afetados, pois esses herbicidas interferem na ação da enzima RNA polimerase e, conseqüentemente, na síntese de ácidos nucleicos e proteínas, induzem intensa proliferação celular em tecidos, causando epinastia de folhas e caule, além de interrupção do floema, impedindo o movimento dos fotoassimilados das folhas para o sistema radicular (FERREIRA et al., 2005).

2.5 Tolerância à herbicidas

A produtividade da cana-de-açúcar, *Saccharum* spp. é diretamente influenciada, entre outros fatores, pela presença de plantas daninhas, as quais, além de dificultarem o corte e a colheita, fazem com que o rendimento industrial decresça, em função da interferência que exercem sobre o desenvolvimento da cultura (FAGLIARI, 2001).

Para evitar perdas provocadas pelas plantas daninhas, deve-se adotar medidas eficientes de manejo. Estas devem ser feitas da forma mais racional possível, integrando medidas culturais, mecânicas e químicas, sendo esta última a que resulta em melhores índices de controle (CHRISTOFFOLETI et al., 2007).

O principal método de controle das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar é o químico através da aplicação de herbicidas, tanto na condição de pré como de pós-emergência (TERRA, 2003). Existem diversos produtos eficientes registrados para esta cultura no Brasil, onde é a segunda cultura que mais utiliza herbicidas no país (PROCÓPIO, 2003). O contínuo

desenvolvimento de novos herbicidas para uso nesta cultura, bem como a dinâmica de introdução ou troca de cultivares, faz com que o estudo da interação destes dois fatores torne-se constante (TERRA, 2003).

No setor sucroalcooleiro, mesmo tendo o conhecimento de que os cultivares apresentam respostas distintas de tolerância a herbicidas (OLIVEIRA, 2004; FERREIRA, 2005), os programas de melhoramento genético focam a seleção dos novos genótipos principalmente para fatores edafoclimáticos, pragas e doenças (MATSUOKA et al., 2005), não considerando a tolerância dos cultivares (SCHIAVETTO et al., 2012).

A planta é sensível a um herbicida quando seu crescimento e desenvolvimento são alterados pela ação do produto; assim, uma planta sensível pode morrer quando submetida à determinada dose do herbicida. Já a tolerância é a capacidade inata de algumas espécies em sobreviver e se reproduzir após o tratamento herbicida, mesmo sofrendo injúrias. Estas características relacionam-se com a variabilidade genética natural da espécie (VARGAS & ROMAN, 2006).

Diferentes cultivares de cana-de-açúcar têm apresentado respostas diferenciadas aos herbicidas, tendo como consequências frequentes problemas de fitotoxicidade, chegando a ocasionar redução na produtividade do canavial (WIXSON, 1991; CONSTANTININ, 1997; VELINE, 2000; PROCÓPIO, 2003; FERREIRA, 2005). O comportamento diferenciado de genótipos de cana-de-açúcar diante de diversos herbicidas associado ao estágio de desenvolvimento desta cultura tem sido fator importante na tolerância de cultivares a herbicidas (VELINI, 2000).

Os herbicidas atualmente em uso na cultura da cana-de-açúcar apresentam variações específicas quanto ao grau de seletividade para a cultura, que depende da dose e época de aplicação, condições edafoclimáticas e estágio fenológico, além das condições fisiológicas e bioquímicas da cultura (SOUZA, 2008). De acordo com Velini et al. (1993) a cultura da cana-de-açúcar pode tolerar até 27% de comprometimento da sua área foliar devido às aplicações de herbicidas, sem prejuízos à produtividade. Rolim & Christoffoleti (1982) relataram que as diversas cultivares de cana-de-açúcar apresentam características morfológicas e fisiológicas diferenciais, sendo provável que ocorram alterações de comportamento quanto a sua tolerância a herbicidas específicos.

A seletividade de herbicidas é a base para o sucesso do controle químico de plantas daninhas na produção agrícola, sendo considerada como uma medida da resposta diferencial de diversas espécies de plantas a um determinado herbicida. Quanto maior a diferença de tolerância entre a cultura e a planta daninha, maior a segurança de aplicação. O conhecimento

a respeito da seletividade de um herbicida é um pré-requisito básico para seu uso ou recomendação, uma vez que revelam quais plantas ele afeta e quais são menos sensíveis ao produto (OLIVEIRA, 2008b).

Ainda de acordo com o mesmo autor, OLIVEIRA (2008a), o metabolismo diferencial ou destoxificação dos herbicidas pelas plantas é provavelmente o mais comum dos mecanismos que contribuem para a seletividade de herbicidas nas plantas. Uma planta capaz de tolerar um herbicida através deste mecanismo é capaz de alterar ou degradar a estrutura química do herbicida através de reações que resultam em substâncias não tóxicas. Plantas que não possuem a habilidade de destoxificar um determinado herbicida são mortas enquanto plantas tolerantes que possuem esta capacidade escapam.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para atender aos objetivos deste trabalho foram desenvolvidos dois experimentos, sendo um utilizando mudas em condições *in vitro*, no estágio de multiplicação das plântulas de cana-de-açúcar e outro na fase de aclimação das mudas – *ex vitro*. As características escolhidas para discriminar as cultivares como tolerantes ou não aos tratamentos, foram definidas com base nos estudos de FERREIRA et al., 2010, que avaliou a tolerância diferencial de cultivares de cana-de-açúcar a estresse por herbicidas utilizando as características altura e perfilhamento todos em relação a uma testemunha sem aplicação do tratamento. Foi utilizada também a avaliação da característica dos sintomas de fitotoxicidade sugerido no trabalho de ARANTES et al. 2010, que consistiu nas avaliações morfológicas em cultivares de cana-de-açúcar submetidas a herbicidas seletivos.

O resultado esperado da distinção das variedades e clones será fornecido pela avaliação das características propostas, de acordo com os tratamentos, sendo avaliado o número de perfilhos, o grau de injúria – nota dos sintomas de fitotoxicidade e peso de matéria seca em tratamento *in vitro* e em *ex vitro*: a altura da planta, número de perfilhos e grau de injúria – nota dos sintomas de fitotoxicidade. Foram coletados resultados aos 7,14 e 21 dias após o tratamento. Em vista de estabelecer a melhor data de resposta significativa dos tratamentos, o dia apresentando o menor coeficiente de variação em comparação aos demais, será considerado o mais eficiente e adequado à proposta do trabalho.

3.1 Cultivo *in vitro* de variedades e clones de cana-de-açúcar

O cultivo *in vitro* (micropropagação) para a obtenção das mudas de cana-de-açúcar foi realizado na Biofábrica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Campus Campos dos Goytacazes, RJ.

3.1.1 Obtenção das plantas matrizes e das fontes de explantes

A planta matriz é aquela da qual serão retirados os explantes, ou seja, o meristema do ápice caulinar, que é o explante utilizado para a cultura *in vitro* da cana-de-açúcar. A obtenção das plantas matrizes das variedades e clones escolhidas para a pesquisa: RB951541, RB966928, RB98710, RB969017, RB979088 e SP79-1011, foram feitas no campo experimental da UFRRJ/Campos dos Goytacazes. Foram coletados cinco colmos de cada

variedade/clone, que foram cortados em mini toletes contendo uma gema e postos para germinar.

Após o período de brotação, as plântulas foram cortadas utilizando-se uma faca que, a cada corte era imersa em uma solução de NaClO a 20% V/V para evitar contaminações. Com a retirada da fonte de explante, realizou-se sua limpeza, como demonstrado na Figura 1, eliminando-se folhas, substrato e raízes.



Figura 1. (A) imersão da faca de corte em solução de NaClO; (B) corte da plântula; (C) limpeza da fonte de explante.

3.1.2 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado segue a metodologia Murashige & Skoog (1962), conhecido como meio de cultura MS (GUERRA & NODARI, 2006).

No cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar, o meio líquido é o meio ideal para a cultura, portanto utiliza-se pontes de papel, para que o explante não fique imerso no meio líquido (Figura 2).

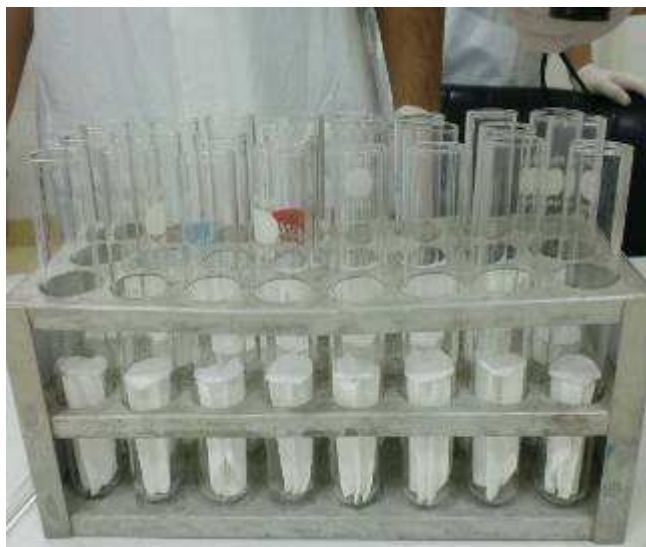


Figura 2. Preparação para inoculação dos explantes - tubos de ensaio com pontes de papel, prontos para receber o meio de cultura e serem autoclavados.

3.1.3 Extração do meristema do ápice caulinar

Primeiramente, todo material utilizado na câmara de fluxo laminar (instrumentos, vidrarias e tubos de ensaio com meio de cultura) foram esterilizados em autoclave para evitar a contaminação por fungos e bactérias.

Antes da extração, os explantes passaram por uma desinfestação com álcool etílico (70%) por 1 minuto, e em hipoclorito de sódio (2% NaClO) por 20 minutos. Após este processo, os explantes passaram por uma rinsagem em água destilada por 3 vezes. (Figura 3)



Figura 3. Desinfestação da fonte de explante

Antes do início dos trabalhos a câmara de fluxo laminar foi limpa com etanol e esterilizada com lâmpada UV por 20 minutos, após isso, acionou-se o fluxo de ar.

Posteriormente, realizou-se o isolamento dos explantes, que consiste na sua extração propriamente dita, como demonstrado na Figura 4, procedimento executado necessariamente na câmara de fluxo laminar, com flambagem de todos os instrumentos utilizados e previamente autoclavados, para evitar qualquer tipo de contaminação. Imediatamente após a extração do meristema (explante), foi feita sua inoculação no tubo de ensaio sobre as pontes de papel, e o meio de cultura, devidamente autoclavados. Com o fim da inoculação, os tubos de ensaio foram para a sala de crescimento, onde as condições do ambiente são controladas, os frascos de vidro utilizados são vedados com tampas possuindo um orifício que controla as trocas gasosas entre o frasco e o ambiente, a fim de manter a umidade em condições ideais, evitando vitrificação dos explantes. A temperatura no ambiente fica em torno de 25°C, a luminosidade de 100 a 110 nm, e fotoperíodo de 12 a 16 horas. Porém, durante os 7 primeiros dias, os tubos de ensaio ficaram cobertos por um filme plástico preto, para evitar a luminosidade, prevenindo a fotooxidação nas fases iniciais de desenvolvimento do explante. Após este período, o plástico foi retirado e o explante permaneceu no tubo de ensaio, por um período de aproximadamente 25 - 30 dias, sendo seu desenvolvimento acompanhado e o frasco agitado diariamente para evitar oxidação. Quando acabou o período de desenvolvimento inicial do explante no tubo de ensaio, sucedeu-se sua transferência para frascos de vidros maiores, contendo 30 ml de meio de cultura de repicagem autoclavado. O período de desenvolvimento até ocorrer a primeira repicagem divergiu de acordo com a variedade ou clone, sendo que a cada 15 dias o explante em desenvolvimento foi transferido para outro frasco, para não ocorrer deficiência nutricional.

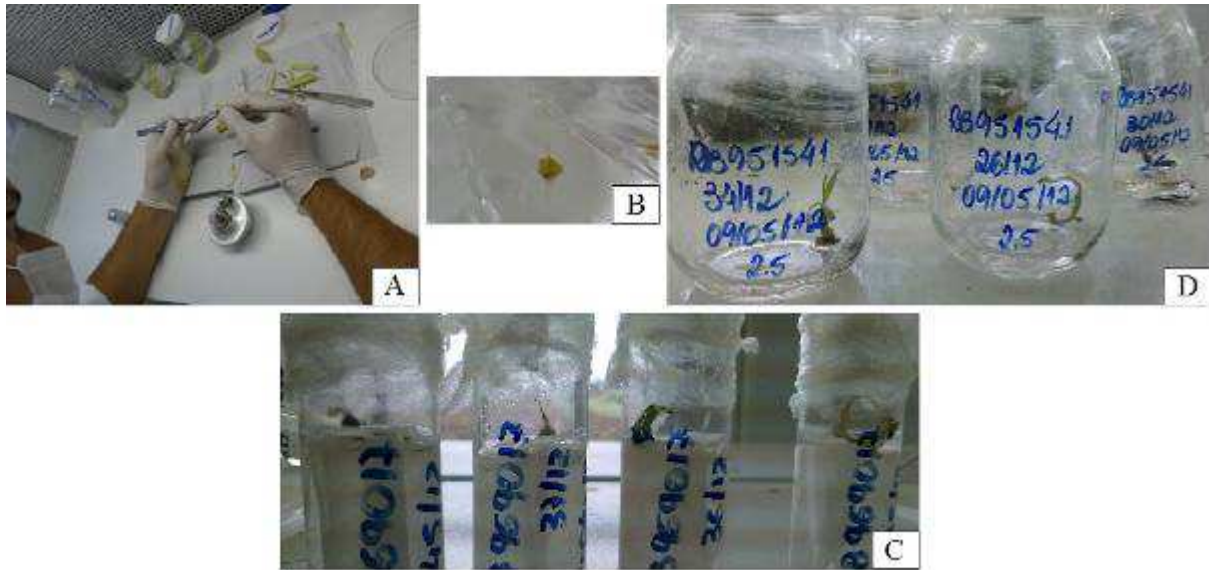


Figura 4. (A) obtenção do explante - extração do meristema apical; (B) explante; (C) explantes desenvolvendo em tubos de ensaio contendo meio de cultura; (D) explantes transferidos para um frasco de vidro maior com meio de cultura para completar seu desenvolvimento.

3.1.4 Repicagem

Após o desenvolvimento do explante com a formação de uma plântula, repicou-se cada variedade ou clone conforme a Figura 5, em câmara de fluxo laminar com pinças e bisturis autoclavados e flambados a cada manuseio, em no máximo de 5-6 subcultivos (repicagens) para não ocorrer a perda do vigor ou variação somaclonal. A taxa de multiplicação desse material é de 1:10, a repicagem foi feita com intervalo de 15-20 dias, dependendo da evolução de desenvolvimento de cada variedade ou clone. Esse procedimento foi repetido até atingir a quantidade necessária de mudas para o experimento, respeitando-se a quantidade máxima de subcultivos.



Figura 5. (A) plântula pronta para ser repicada; (B) processo de repicagem.

3.1.5 Enraizamento

Em sequência, obtida a quantidade de mudas necessárias para experimento *ex vitro*, as plântulas seguiram para o processo de enraizamento *in vitro*. Nessa etapa, os frascos de vidro, como visto na Figura 6, contêm um meio de cultura especial – meio de cultura para enraizamento. Esse meio inclui auxina (hormônio indutor de desenvolvimento de raízes adventícias) e carvão ativado (para evitar a oxidação e também devido ao fototropismo negativo para o desenvolvimento das raízes).



Figura 6. Plântula em meio de cultura de enraizamento, desenvolvendo raízes adventícias.

3.2 Experimento *in vitro*

Com objetivo de estabelecer metodologias para avaliação precoce da tolerância de variedades e clones de cana-de-açúcar a herbicidas, foi feito um experimento com plântulas ainda na fase *in vitro*, no estágio de multiplicação das plântulas. Para isso foram testadas as variedades que mais se destacaram em desenvolvimento nesse meio de propagação *in vitro*: RB951541, RB966928 e SP79-1011.

O tratamento das plântulas foi feito com os herbicidas: clomazone; MSMA e diuron. As doses 1 utilizadas de acordo com a recomendação do fabricante foram: clomazone: 1,0 kg i.a./ha; MSMA: 2,47 kg i.a./ha; e diuron: 2,4 kg i.a./ha. Sendo a dose 2, o dobro da dose 1 e a dose 3 o triplo da dose 1. Sendo os frascos com os tratamentos dispostos em prateleiras, separados por tratamento e por variedade.

O primeiro cálculo foi realizado para estabelecer a quantidade de produto para uma calda de 1 litro de água. A fim de simplificar os cálculos, os valores das medidas foram reduzidos para unidades – mL ou g. Portanto, de forma genérica, para um volume de 1 litro de calda, faz-se necessária a adição de uma quantidade X de ingrediente ativo de cada herbicida, cujos resultados obtidos são:

Clomazone: 2.000 mL de produto – 400.000 mL de água X= 5 mL de produto/L água
X mL de produto – 1.000 mL de água

MSMA: 3.000 mL de produto – 400.000 mL de água X= 7,5 mL de produto/L água
X mL de produto – 1.000 mL de água

Diuron: 3.000 g de produto – 400.000 mL de água X= 7,5 g de produto/L água
X g de produto – 1.000 mL de água

Após estabelecida as doses para 1 litro de calda, procedeu-se os cálculos de diluição do produto para ser adicionado em 30 mL de meio de cultura. A concentração de produto para o tratamento *in vitro*, foi feita considerando-se os aspectos de campo. Levando-se em conta, a Capacidade de Campo de 30% e 20 cm de profundidade (área de atuação do herbicida) foi estimado a quantidade (volume) de água no solo = 10.000 m^2 (1 ha) x 0,2 m (profundidade) x 30% (capacidade de campo) = 600.000 L de água no solo.

Portanto, a concentração das doses para os produtos, considerando-se a recomendação do fabricante, ficou estabelecida em:

Clomazone: 2,0 L em 600.000 L de água disponível no solo (em 1 hectare) → 1:300.000 (concentração)

MSMA: 3,0 L em 600.000 L de água disponível no solo (em 1 hectare) → 1:200.000

Diuron: 3,0 kg em 600.000 L de água disponível no solo (em 1 hectare) → 1:200.000

Para o tratamento com o herbicida Clomazone as diluições para atingir a concentração calculada foi realizada do seguinte modo: 1ª diluição - 5 mL do ingrediente ativo em 500 mL de H₂O, 2ª diluição - 5mL da solução da 1ª diluição em 500 mL de H₂O. Levando em consideração que os frascos possuem um meio líquido de 30 mL, a concentração do tratamento de 1:300.000 como foi estabelecida anteriormente, já foi adquirida com essas duas diluições. Ao atingir a concentração, injetou-se 1 mL da solução final, dentro dos frascos com as plântulas. O mesmo cálculo e procedimento foram realizados para os demais herbicidas, respeitando-se cada particularidade de suas concentrações e quantidade de produto recomendados.

Para evitar contaminação do meio de cultura e conseqüentemente um falso resultado do tratamento, em todas as diluições foram utilizadas vidrarias e água destilada, ambos autoclavados, com manuseio feito em câmara de fluxo laminar. Como os herbicidas não podem sofrer autoclavagem para não perderem suas características, a injeção dos herbicidas no meio de cultura foi feita utilizando-se seringas estéreis acopladas a filtros também estéreis, formados por uma membrana interna com tamanho de poro de 0,22µm, não permitindo a passagem de microorganismos. Com o uso desses filtros foi alcançado 0% de contaminação do meio de cultura.

Foi utilizado 1 vidro para cada tratamento, de acordo com o esquema fatorial: 3x3x4 (variedade x herbicida x dose), com 10 repetições cada.

Após cada tratamento, os frascos voltaram para a sala de ambiente controlado, permanecendo até o fim das avaliações.

As características avaliadas foram: o número de perfilhos, o grau de injúria (sintoma de fitotoxicidade) e peso seco das plântulas, as leituras deram-se em 7, 14 e 21 dias após o tratamento (DAT), com exceção do peso seco que a leitura foi apenas aos 21 dias.

Para as notas dos sintomas de fitotoxicidade, as avaliações sucederam empregando-se notas em uma escala de 1 a 5, onde a nota 1 correspondia a nenhuma injúria causada pelo tratamento (0% de sintomas visuais causados pelo tratamento, como amarelecimento ou branqueamento), nota 2 (cerca de 25% de folhas com sintomas visuais de danos), nota 3 (cerca

de 50% de danos visuais), nota 4 (cerca de 75% de danos nas folhas) e nota 5 (100% da plântula com danos visuais ou a morte devido o tratamento).

A avaliação do peso de matéria seca realizou-se aos 21 dias após o tratamento, utilizando uma estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até ser obtido peso constante.

3.3 Experimento *ex vitro*

Para o experimento *ex vitro*, após o estágio de enraizamento *in vitro*, as plântulas das variedades de cana-de-açúcar: RB951541, RB966928, RB98710 e SP79-1011 e os clones: RB969017 e RB979088 foram repicados em copinhos de plástico de 300 ml, contendo substrato de areia + torta de filtro, foi colocada uma muda em cada copo e identificada por palitos de madeira, descrevendo através de códigos, a variedade e o tipo de tratamento que sofreria. Esta etapa é denominada fase de aclimação, quando ocorre transição da condição heterotrófica para autotrófica. O principal objetivo neste estágio é diminuir ao máximo as perdas que ocorrem, principalmente pela desidratação dos tecidos da microplanta, sendo a irrigação feita diariamente para evitar tal problema. As mudas foram dispostas sobre um telado, por um período de 15 dias, para controlar a intensidade luminosa, pois neste estágio a microplanta não está com sua capacidade fotossintética em sua total funcionalidade. Após 15 dias sobre telado, as mudas foram para o viveiro primário, sendo submetidas às condições normais do ambiente, mantendo as irrigações diárias. Para finalizar a aclimação, as mudas permaneceram no viveiro primário por 35 dias, antes de receber o tratamento, totalizando 50 dias de aclimação antes da aplicação dos herbicidas.

O experimento consistiu em blocos inteiramente casualizados com o esquema 5x6x4 (herbicida x variedade x dose) com 10 repetições cada.

Os herbicidas utilizados foram: clomazone; MSMA; diuron; hexazinona + diuron e 2,4-D.

As doses 1 utilizadas, conforme a recomendação do fabricante, foram: clomazone: 1,0 kg i.a./ha; 2,4-D: 1,62 kg i.a./ha; MSMA: 2,47 kg i.a./ha; diuron: 2,4 kg i.a./ha e hexazinona+diuron: 0,264 + 0,936 kg i.a./ha. Sendo a dose 2, o dobro da dose 1 e a dose 3 o triplo da dose 1.

A aplicação foi feita utilizando um pulverizador costal, pressurizado por CO₂ a uma pressão de trabalho de 30 lb pol⁻², acoplado a uma única ponta de pulverização com jato tipo plano. As caixas foram colocadas em fileiras ao abrigo de luz direta e vento, para não interferir na aplicação.

As avaliações foram feitas aos 7 dias após o tratamento (DAT), 14 DAT e 21 DAT, sendo avaliados o número de perfilhos, notas dos sintomas de fitotoxicidade e tamanho da planta.

Para a característica notas para os sintomas de fitotoxicidade, as avaliações sucederam empregando-se notas em uma escala de 1 a 5, onde a nota 1 correspondia a nenhuma injúria causada pelo tratamento (0% de sintomas visuais causados pelo tratamento, como amarelecimento ou branquiamento), nota 2 (cerca de 25% de folhas com sintomas visuais de danos), nota 3 (cerca de 50% de danos visuais), nota 4 (cerca de 75% de danos nas folhas) e nota 5 (100% da planta com danos visuais ou a morte devido o tratamento).

Para medir o tamanho, utilizou-se uma régua, medindo da base até a primeira lígula visível da planta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR - Sistema para análise de variância para dados balanceados (FERREIRA, 1992).

Para discriminar a melhor data de avaliação das características dos ensaios, utilizou os dados do coeficiente de variação. Portanto para análise do número de perfilhos e das notas dos sintomas de fitotoxicidade, no experimento *in vitro*, o menor resultado do CV% para ambas as características foram aos 21 DAT, apresentando os valores de 28,77 e 24,39 respectivamente.

Para o experimento *ex vitro*, em função do mesmo critério, a melhor época de avaliação foi 21 dias após o tratamento, como no experimento *in vitro*, utilizando as notas dos sintomas de fitotoxicidade apresentando CV de 12,37%.

4.1 Experimento *in vitro*

Para identificar a significância da interação fatorial (variedade x herbicida e herbicida x dose) foi aplicado o teste F na análise da variância, para todas as características avaliadas. FERREIRA et al. (2010) que trabalhou com tolerância de variedades à herbicidas com mudas oriundas de biofábrica, também aplicou o teste F na análise da variância, identificando a significância da interação fatorial (herbicidas x variedades) para todas as variáveis avaliadas, assim os efeitos isolados dos fatores foram desconsiderados e analisaram-se detalhadamente as interações entre eles.

No experimento *in vitro* as interações variedade x herbicida e herbicida x dose, aos 21 dias, na análise das características notas dos sintomas de fitotoxicidade, número de perfilhos e peso da matéria seca, foram significativas quando as médias das características foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância (Tabelas 1, 2 e 3).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Variedade	2	21.538889	10.769444	36.648	0.0000
Herbicida	2	94.105556	47.052778	160.120	0.0000
Dose	3	204.955556	68.318519	232.487	0.0000
Variedade*Herbicida	4	12.827778	3.206944	10.913	0.0000
Herbicida*Dose	6	32.294444	5.382407	18.316	0.0000
erro	342	100.500000	0.293860		
Total corrigido	359	466.222222			
CV (%) =	24.39				
Média geral:	2.222222	Número de observações:	360		

Tabela 1. Análise de variância da característica notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 DAT, no experimento *in vitro*.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Variedade	2	401.838889	200.919444	23.476	0.0000
Herbicida	2	1118.288889	559.144444	65.331	0.0000
Dose	3	378.786111	126.262037	14.753	0.0000
Variedade*Herbicida	4	45.461111	11.365278	1.328	0.2592
Herbicida*Dose	6	75.222222	12.537037	1.465	0.1894
erro	342	2927.066667	8.558674		
Total corrigido	359	4946.663889			
CV (%) =	28.77				
Média geral:	10.169444	Número de observações:	360		

Tabela 2. Análise de variância da característica número de perfilhos aos 21 DAT, no experimento *in vitro*

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Variedade	2	0.907271	0.453635	378.025	0.0000
Herbicida	2	0.450671	0.225335	187.777	0.0000
Dose	3	0.105536	0.035179	29.315	0.0000
Variedade*Herbicida	4	0.358325	0.089581	74.650	0.0000
Herbicida*Dose	6	0.006835	0.001139	0.949	0.4597
erro	342	0.410405	0.001200		
Total corrigido	359	2.239043			
CV (%) =	8.33				
Média geral:	0.4159694	Número de observações:	360		

Tabela 3. Análise de variância da característica peso de matéria seca, no experimento *in vitro*

Em relação à classificação das notas dos sintomas de fitotoxicidade (1, 2, 3, 4, 5) foram estabelecidas conforme apresentado na sequência de figuras de 7 a 15, considerando cada tratamento: herbicida + variedade (como em nenhum tratamento não houve plântulas com 100% de folhas com danos visuais ou plântulas mortas, não foram obtidas imagens da nota 5):

- Herbicida Clomazone + Variedade RB951541

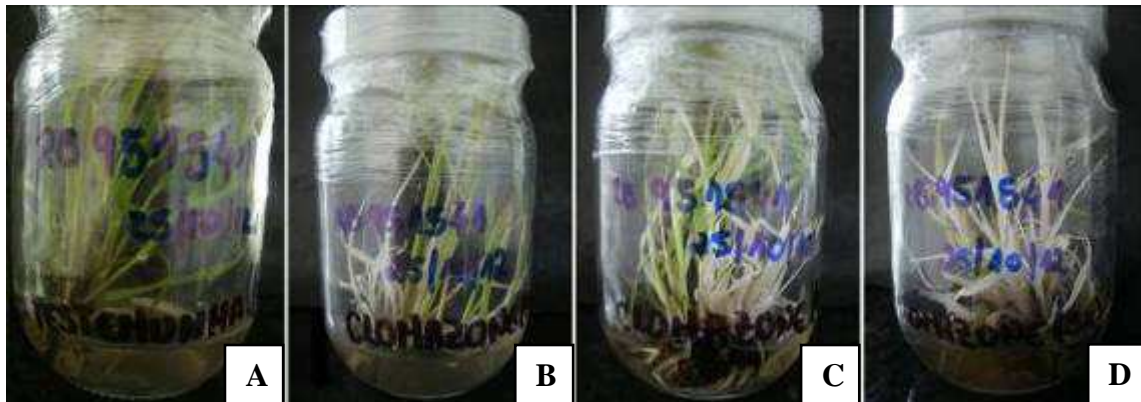


Figura 7. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.

- Herbicida MSMA + Variedade RB951541

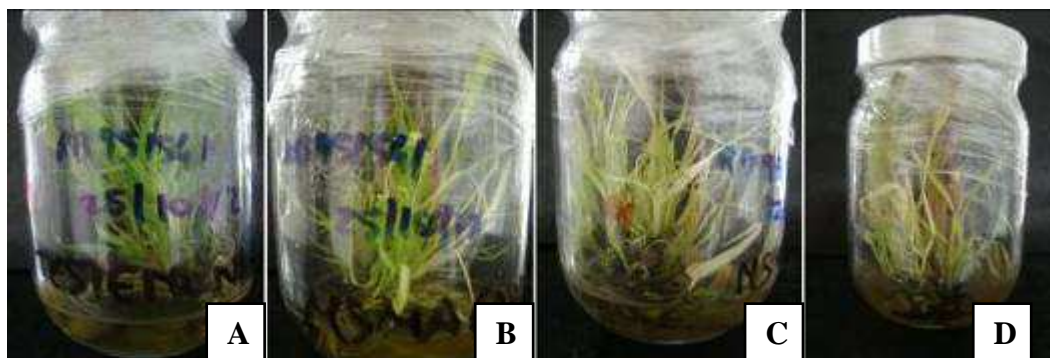


Figura 8. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.

- Herbicida Diuron + Variedade RB951541

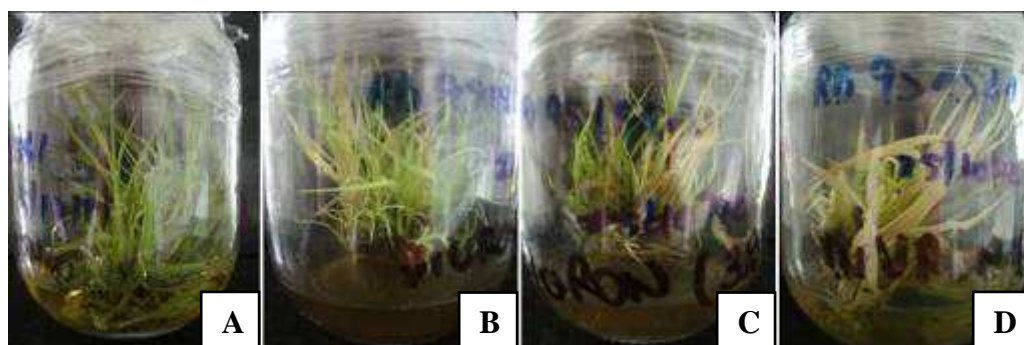


Figura 9. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.

- Herbicida Clomazone + Variedade SP79-1011

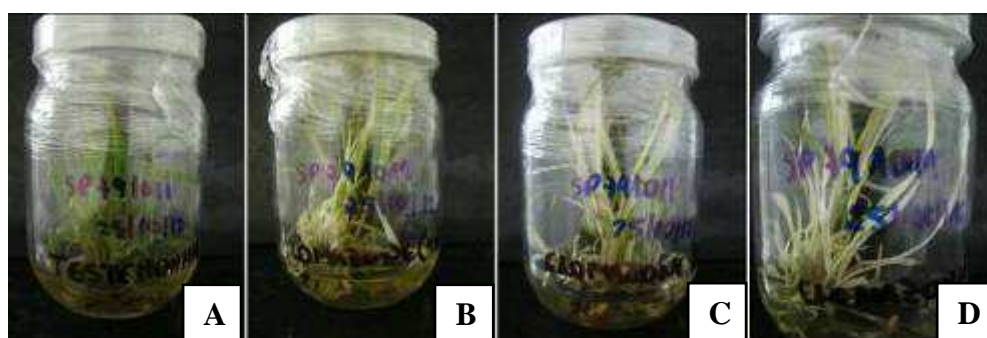


Figura 10. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.

- Herbicida MSMA + Variedade SP79-1011

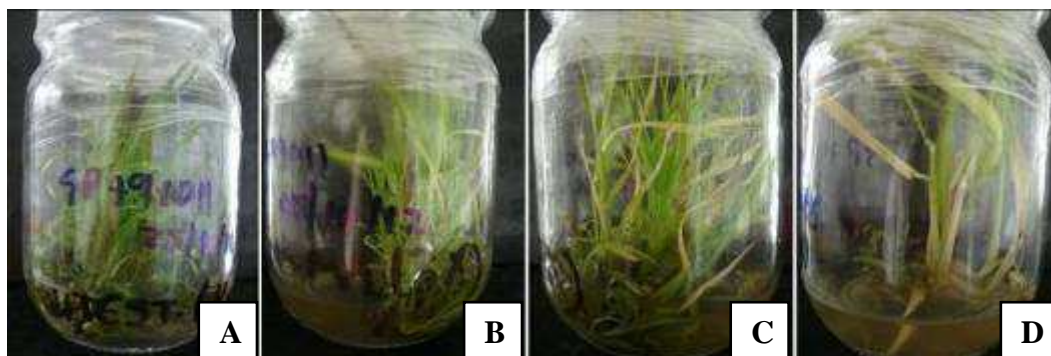


Figura 11. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.

- Herbicida Diuron + Variedade SP79-1011

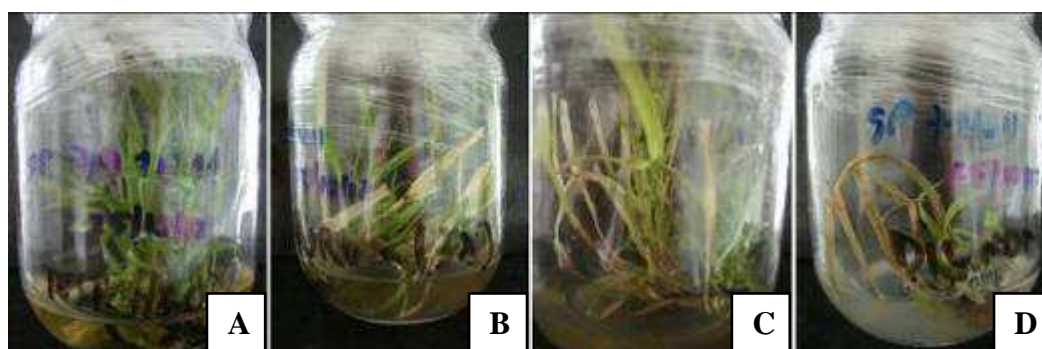


Figura 12. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.

- Herbicida Clomazone + Variedade RB966928

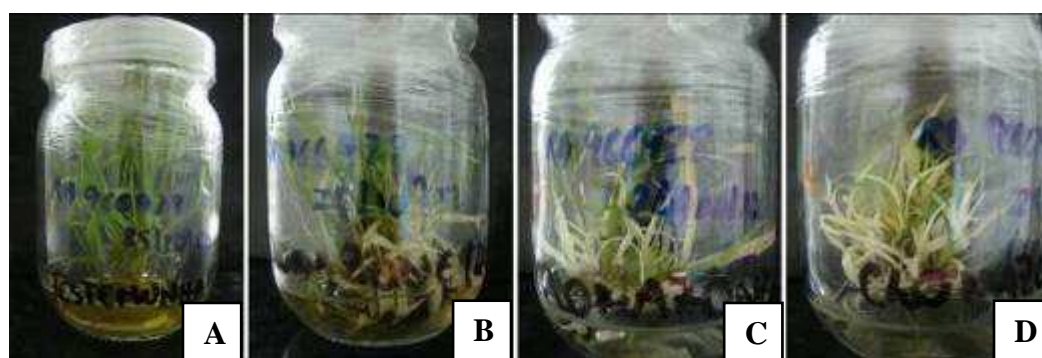


Figura 13. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.

- Herbicida MSMA + Variedade RB966928

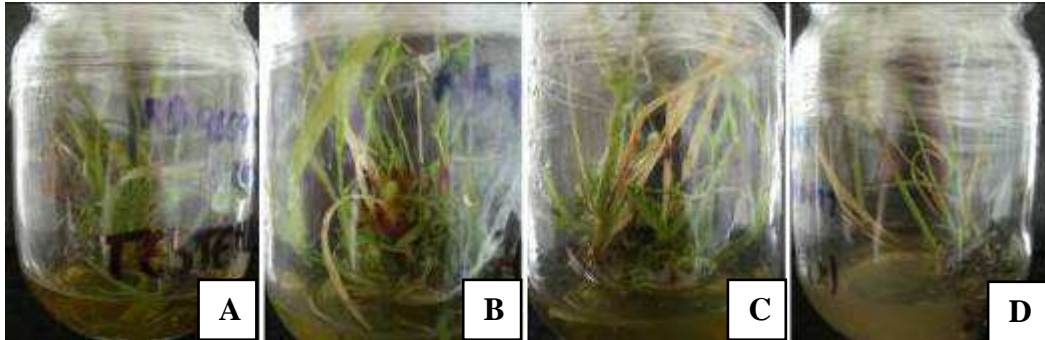


Figura 14. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.

- Herbicida Diuron + Variedade RB966928



Figura 15. (A) nota 1 – sem injúria – não apresenta sintomas de fitotoxicidade; (B) nota de injúria 2; (C) nota de injúria 3; (D) nota de injúria 4.

4.1.1 Tolerância ao Herbicida Clomazone

Aos 21 DAT para o tratamento com o herbicida clomazone, de acordo com as notas dos sintomas de fitotoxicidade, todas as doses diferiram entre si e entre a testemunha (Figura 16). Como a dose 1 já manifestou diferença significativa em relação a testemunha, a utilização desta dose, mostra-se eficiente para a tolerância ao herbicida clomazone. O experimento *in vitro* conseguiu discriminar as variedades através da característica notas dos sintomas de fitotoxicidade, mostrando que a variedade RB951541 diferiu das demais com maior média de notas sendo a menos tolerante ao tratamento com este herbicida. A RB966928 apresentou a menor média da nota de fitotoxicidade, caracterizando-a como tolerante ao tratamento, a variedade SP79-1011 não diferiu da RB966928 demonstrando também uma tolerância ao tratamento (Figura 17).

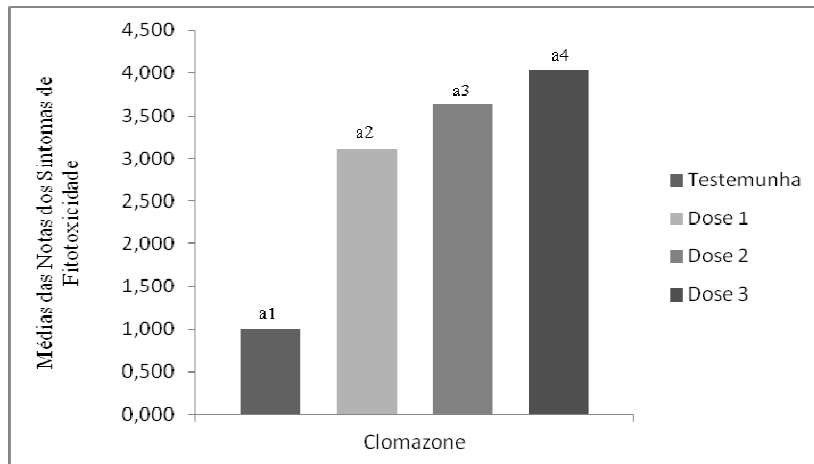


Figura 16. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

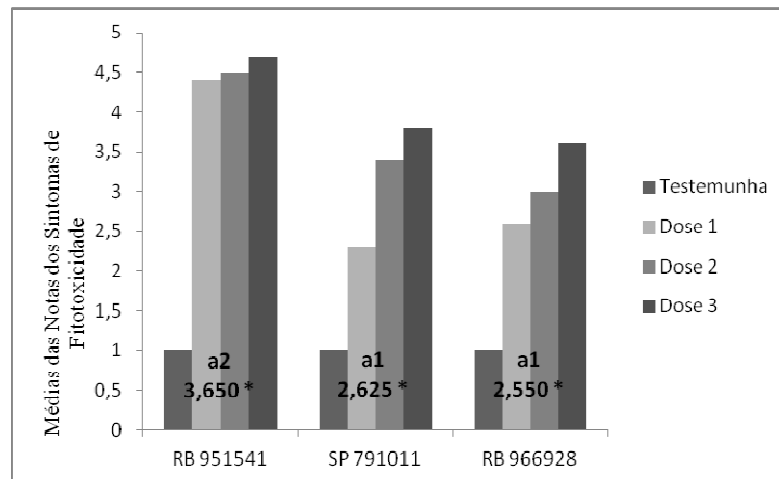


Figura 17. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro* submetidas à aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a característica número de perfilhos no tratamento com o herbicida clomazone, as doses diferiram da testemunha, porém não diferiram entre si (Figura 18), sendo que as plantas tratadas com o herbicida apresentaram menor número de perfilhos em relação à testemunha, sendo a dose 1 suficiente para a distinção das variedades .

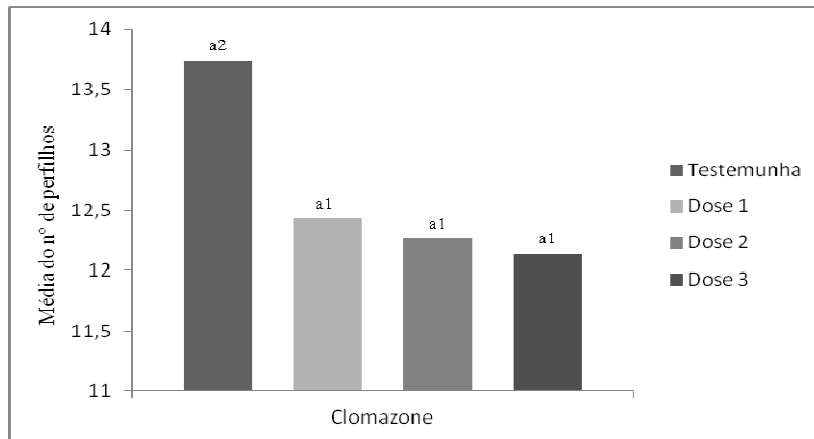


Figura 18. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A variedade SP79-1011 apresentou menor número médio de perfilhos, a variedade RB966928 a maior média de perfilhamento sendo a mais tolerante ao tratamento e a variedade RB951541 não diferiu das demais variedades no tratamento com o herbicida clomazone (Figura 19).

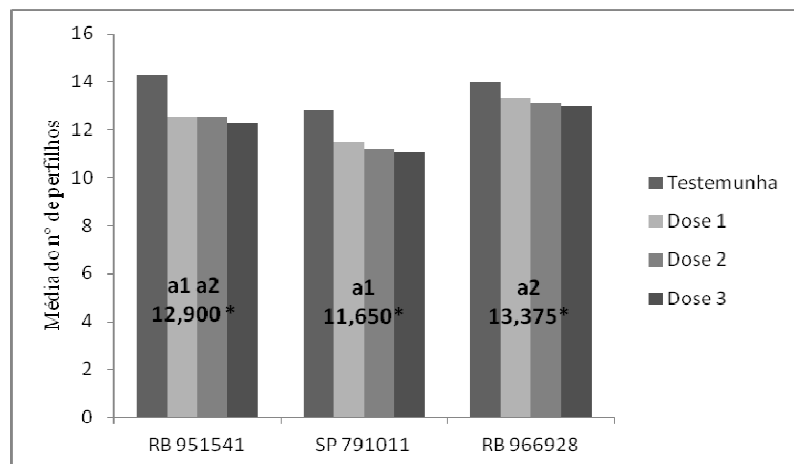


Figura 19. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro* submetidas à aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A característica peso de matéria seca foi significativo na interação dose x herbicida, podendo-se observar que a dose 2 não diferiu das demais (Figura 20), sendo que as plantas submetidas a dose 1 já demonstraram diferença significativa da testemunha. A variedade RB951541 diferiu das demais com o menor peso de matéria seca, apresentando maior sensibilidade ao tratamento com o herbicida clomazone. A variedade SP79-1011 apresentou significativamente maior peso de matéria seca que as demais variedades (Figura 21).

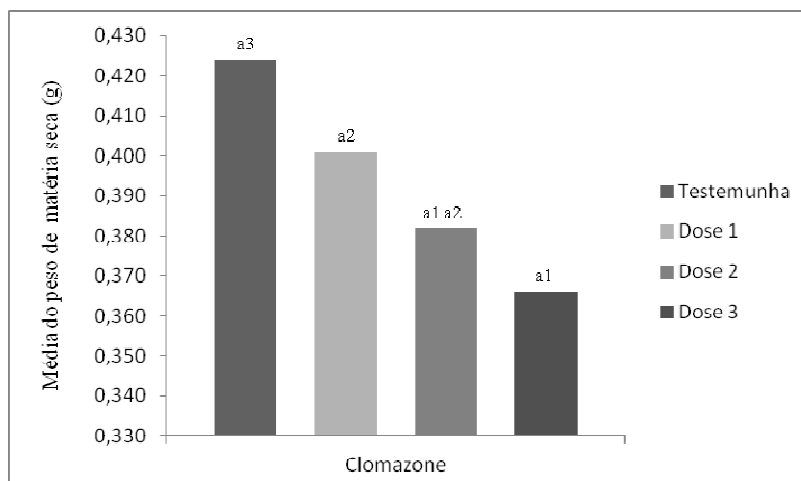


Figura 20. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

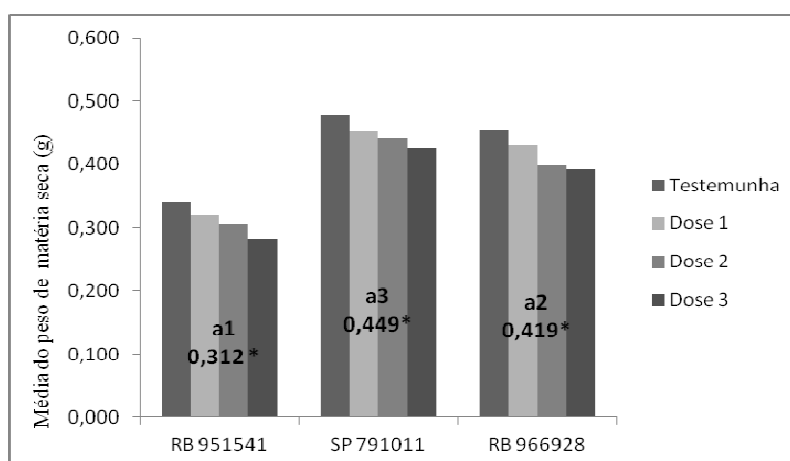


Figura 21. Média do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro* submetidas à aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o herbicida clomazone houve uma coincidência no comportamento das variedades nas características peso de matéria seca e nota dos sintomas de fitotoxicidade, sendo que a variedade RB951541 comportou-se como a menos tolerante e a SP79-1011 como a mais tolerante.

4.1.2 Tolerância ao Herbicida MSMA

Os resultados mostram que nas notas dos sintomas de fitotoxicidade, as plantas tratadas com as doses do herbicida, diferiram da testemunha (Figura 22), mostrando efeito do

herbicida sobre as 3 variedades, entretanto, as variedades RB951541, RB966928 e SP79-1011 foram afetadas pelo herbicida de forma semelhante não havendo diferença de comportamento entre elas (Figura 23).

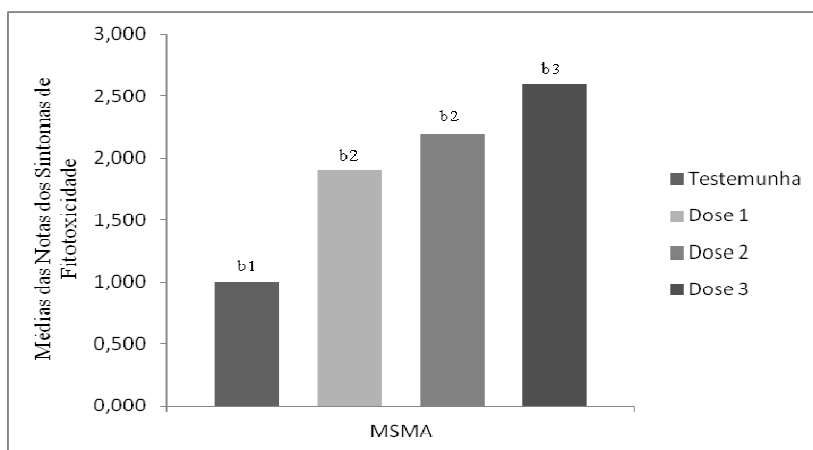


Figura 22. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

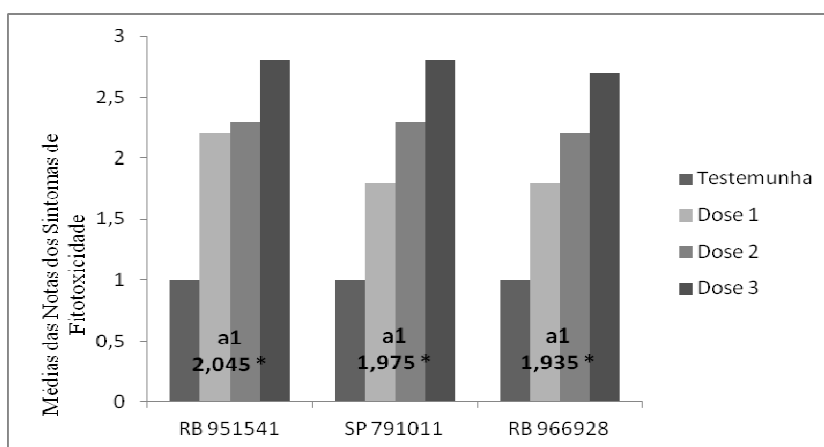


Figura 23. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro* submetidas à aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a característica número de perfilhos no tratamento com o herbicida MSMA, não houve diferença significativa entre as doses aplicadas e a testemunha (Figura 24), ou seja, o perfilhamento nas plantas não foi afetado com a aplicação do herbicida. O resultado mostrou que a variedade RB951541 não diferiu da variedade SP79-1011, com a menor média de perfilhamento. A RB966928 apresentou maior média de perfilhos (Figura 25).

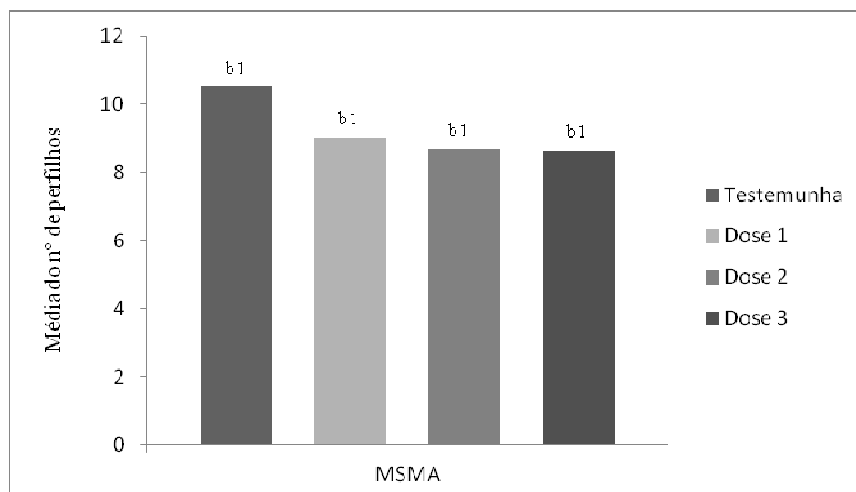


Figura 24. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

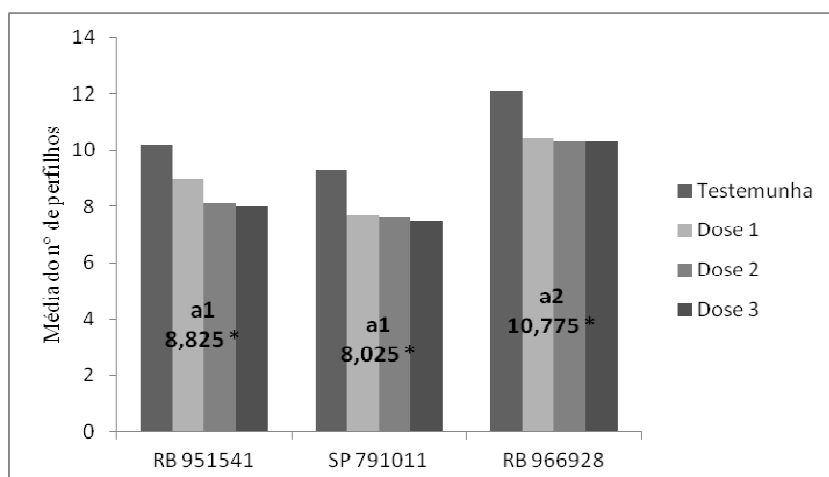


Figura 25. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro* submetidas à aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na característica peso da matéria seca, nenhuma das doses diferiu entre si, porém diferiram da testemunha (Figura 26). As variedades RB951541 e SP79-1011 não diferiram entre si na característica PMS, sendo a RB966928 diferente das demais apresentando maior PMS (Figura 27).

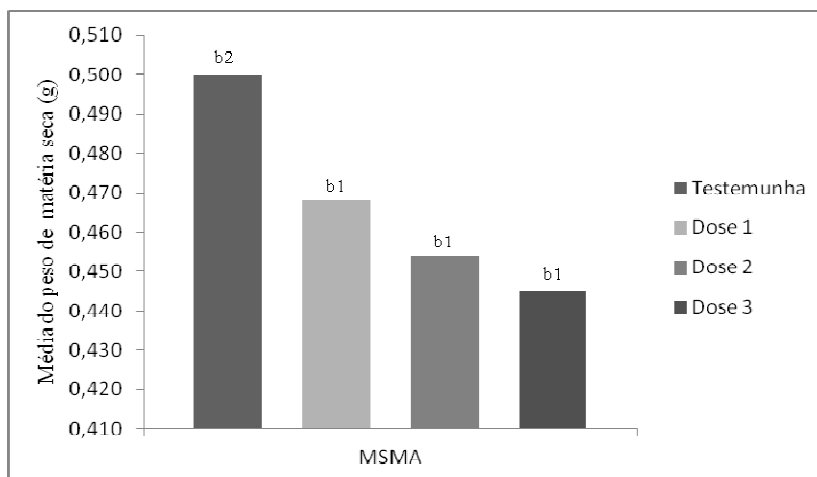


Figura 26. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

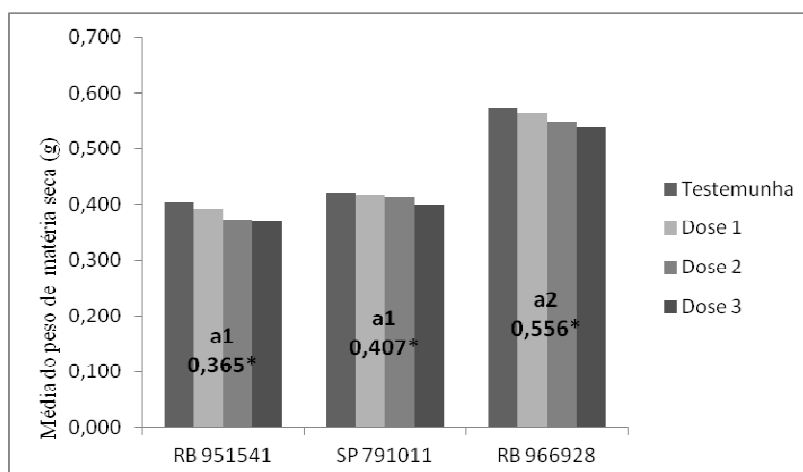


Figura 27. Média do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro* submetidas à aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o herbicida MSMA, a característica peso da matéria seca demonstrou maior eficiência para distinção de tolerância de variedades de cana-de-açúcar.

4.1.3 Tolerância ao Herbicida Diuron

Nas análises dos resultados do efeito de doses para o herbicida diuron, mostrados nas figuras 28, 29 e 30, houve efeito significativo de doses para as três características analisadas, de acordo com o gráfico pode-se observar que a dose 1 foi suficiente para a distinção da testemunha.

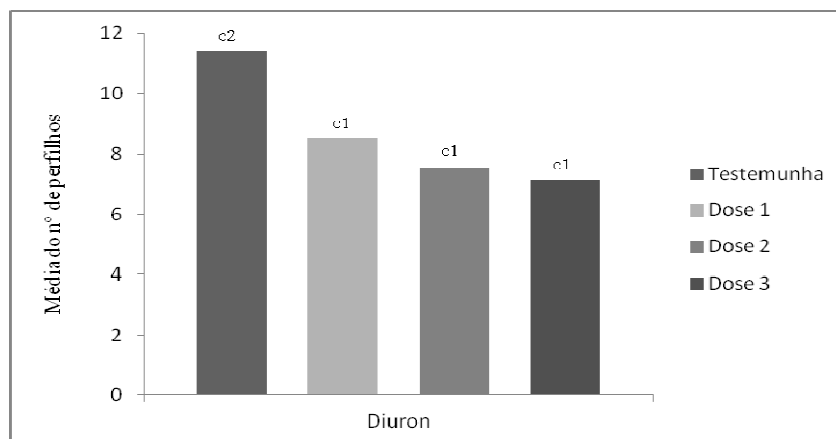


Figura 28. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

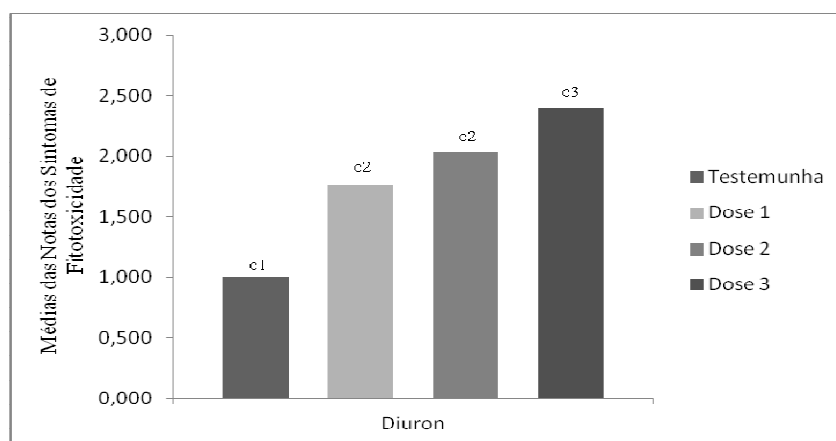


Figura 29. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

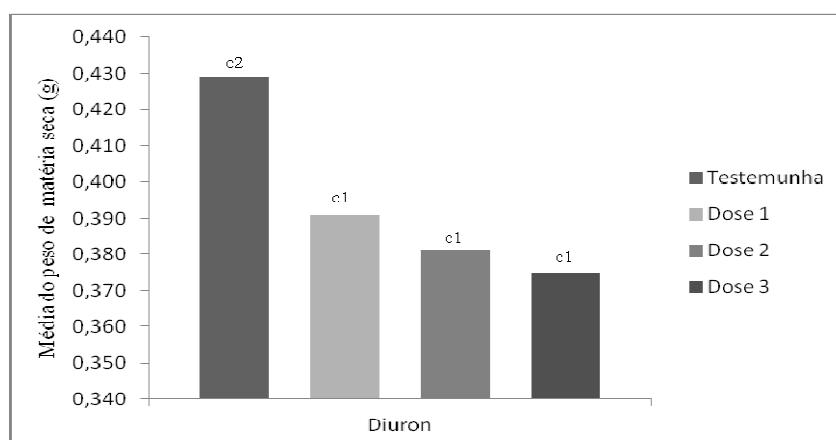


Figura 30. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise da característica notas dos sintomas de fitotoxicidade para o tratamento com diuron, a RB966928 apresentou menos sintomas, não diferindo da SP79-1011 (Figura 31).

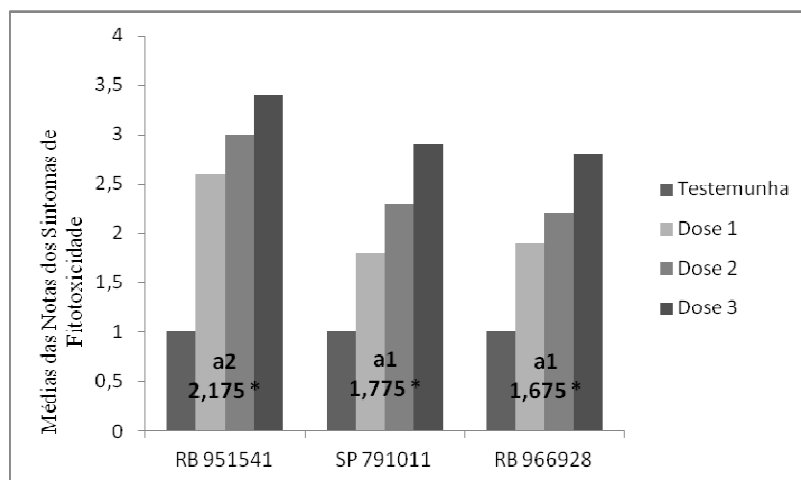


Figura 31. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro* submetidas à aplicação do herbicida Diuron. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise de variedades para o efeito do herbicida diuron na característica número de perfilhos a variedade SP79-1011 diferiu das demais, apresentando menor número de perfilhos, indicando menor tolerância ao diuron (Figura 32).

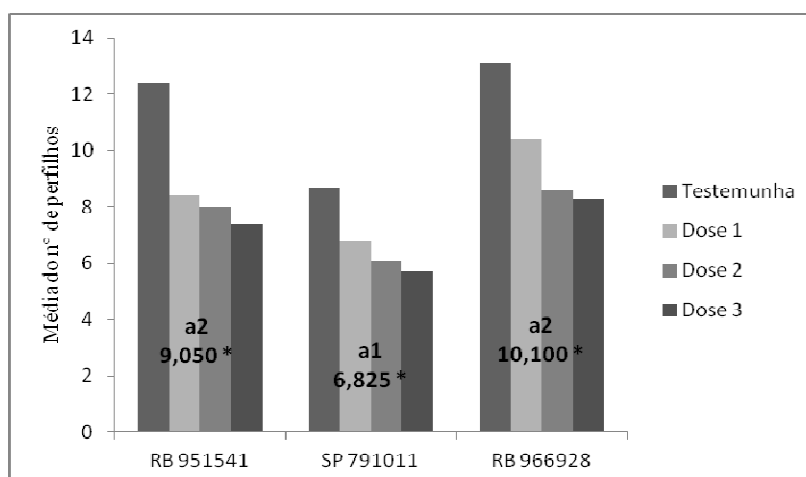


Figura 32. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro* submetidas à aplicação do herbicida Diuron. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o peso de matéria seca (Figura 33), a RB966928 apresentou maior peso, a variedade RB951541 menor peso em relação as demais variedades, sendo a mais sensível ao tratamento, tanto para a característica notas dos sintomas de fitotoxicidade quanto para peso

de matéria seca. Para o tratamento com o herbicida diuron as variedades RB966928 e SP79-1011 apresentaram maior tolerância, em comparação a RB951541 com maior sensibilidade, resultado semelhante ao apresentando com o herbicida clomazone.

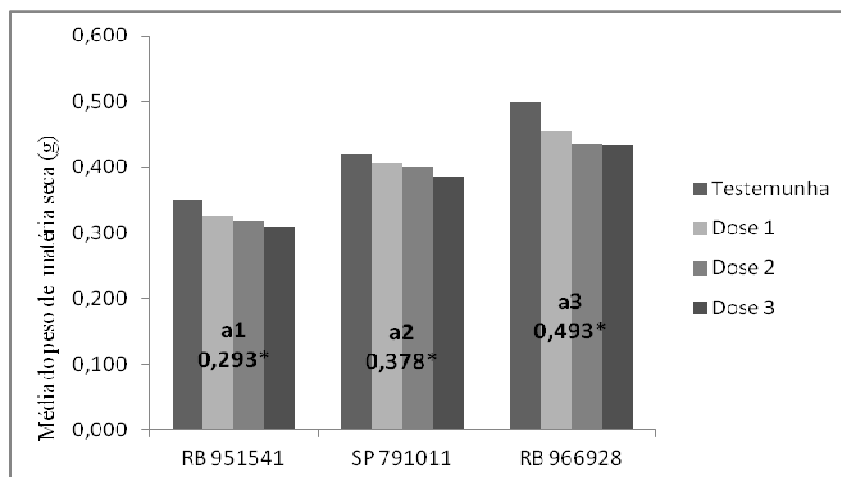


Figura 33. Média do peso de matéria seca aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *in vitro* submetidas à aplicação do herbicida Diuron. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 Experimento *ex vitro*

Para o experimento *ex vitro*, todas as interações variedade x herbicida e herbicida x dose, aos 21 dias, na análise das características notas dos sintomas de fitotoxicidade, número de perfilhos e altura foram significativas quando as médias foram submetidas ao teste F (Tabelas 4, 5 e 6).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Variedade	5	8.576667	1.715333	8.848	0.0000
Herbicida	4	193.291667	48.322917	249.248	0.0000
Dose	3	2651.176667	883.725556	4558.236	0.0000
Variedade*Herbicida	20	14.698333	0.734917	3.791	0.0000
Herbicida*Dose	12	94.248333	7.854028	40.511	0.0000
erro	1155	223.925000	0.193874		
Total corrigido	1199	3185.916667			
CV (%) =	12.37				
Média geral:	3.5583333	Número de observações:	1200		

Tabela 4. Análise de variância da característica notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 DAT, no experimento *ex vitro*.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Variedade	5	258.494167	51.698833	48.578	0.0000
Herbicida	4	121.683333	30.420833	28.584	0.0000
Dose	3	2544.535833	848.178611	796.971	0.0000
Variedade*Herbicida	20	90.776667	4.538833	4.265	0.0000
Herbicida*Dose	12	132.276667	11.023056	10.358	0.0000
erro	1155	1229.212500	1.064253		
Total corrigido	1199	4376.979167			
CV (%) =	73.47				
Média geral:	1.4041667	Número de observações:	1200		

Tabela 5. Análise de variância da característica número de perfilhos aos 21 DAT, no experimento *ex vitro*.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Variedade	5	1653.039167	330.607833	65.574	0.0000
Herbicida	4	5680.234583	1420.058646	281.660	0.0000
Dose	3	10880.551667	3626.850556	719.363	0.0000
Variedade*Herbicida	20	784.675417	39.233771	7.782	0.0000
Herbicida*Dose	12	2166.258750	180.521563	35.805	0.0000
erro	1155	5823.227083	5.041755		
Total corrigido	1199	26987.986667			
CV (%) =	45.70				
Média geral:	4.9133333	Número de observações:	1200		

Tabela 6. Análise de variância da característica altura aos 21 DAT, no experimento *ex vitro*.

Como dito anteriormente em material e métodos, para a avaliação das notas dos sintomas de fitotoxicidade, foram utilizadas notas em uma escala de 1 a 5. As escalas da nota seguiram-se os padrões de acordo com as Figuras 34 a 38.

Para o herbicida Clomazone:



Figura 34. Sequência de notas do grau de injúria – sintomas de fitotoxicidade, causado pelo tratamento com o herbicida Clomazone.

Para o herbicida Diuron



Figura 35. Sequência de notas do grau de injúria – sintomas de fitotoxicidade, causado pelo tratamento com o herbicida Diuron.

Para o herbicida MSMA:



Figura 36. Sequência de notas do grau de injúria – sintomas de fitotoxicidade, causado pelo tratamento com o herbicida MSMA.

Para o herbicida Hexazinona + Diuron:

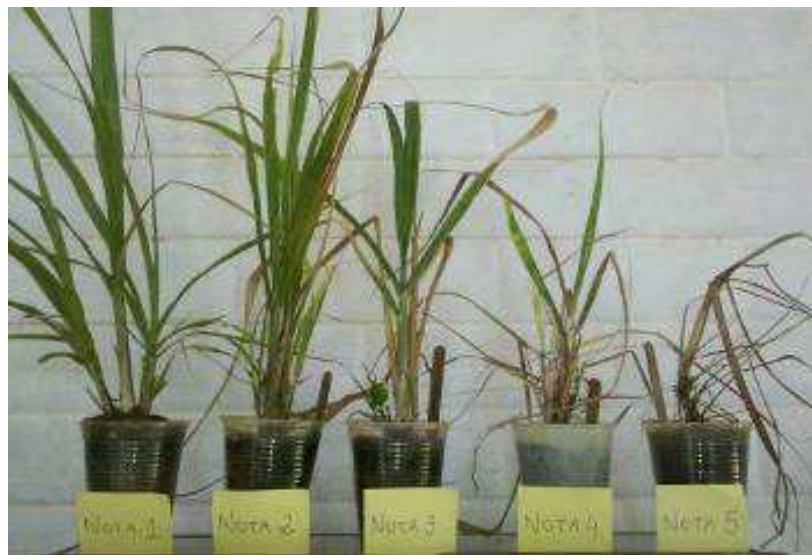


Figura 37. Sequência de notas do grau de injúria – sintomas de fitotoxicidade, causado pelo tratamento com o herbicida Hexazinona + Diuron

Para o herbicida 2,4-D

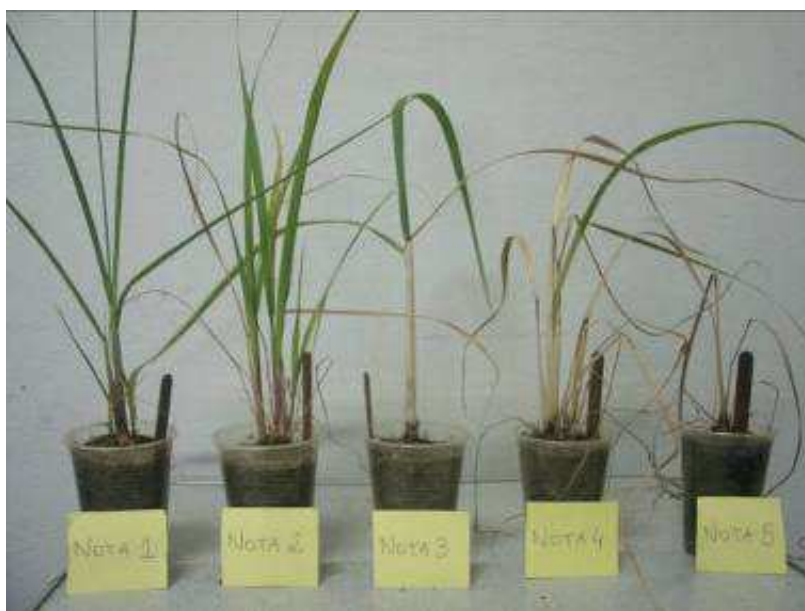


Figura 38. Sequência de notas do grau de injúria – sintomas de fitotoxicidade, causado pelo tratamento com o herbicida 2,4-D

4.2.1 Tolerância ao Herbicida Clomazone

Para os resultados do herbicida clomazone nas avaliações das características número de perfilhos, notas dos sintomas de fitotoxicidade e altura, aos 21 DAT, as doses distinguiram-se significativamente da testemunha, sendo suficiente a dose 1 para diferenciar as variedades (Figuras 39, 40 e 41).

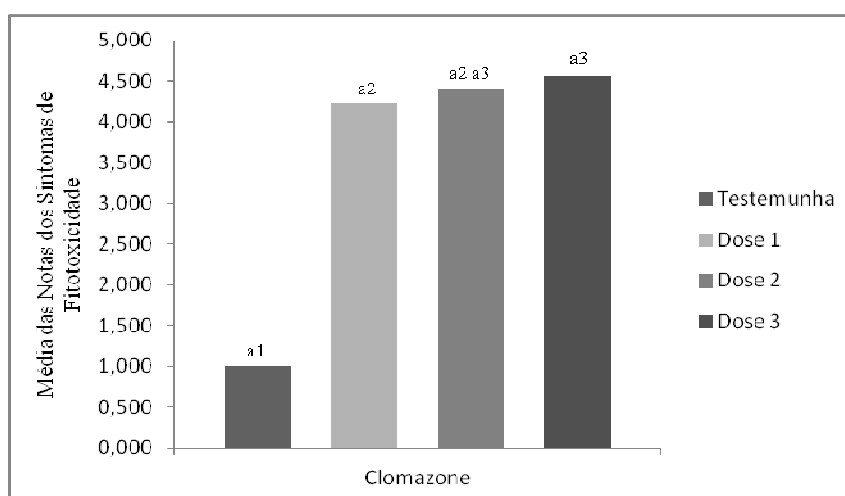


Figura 39. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

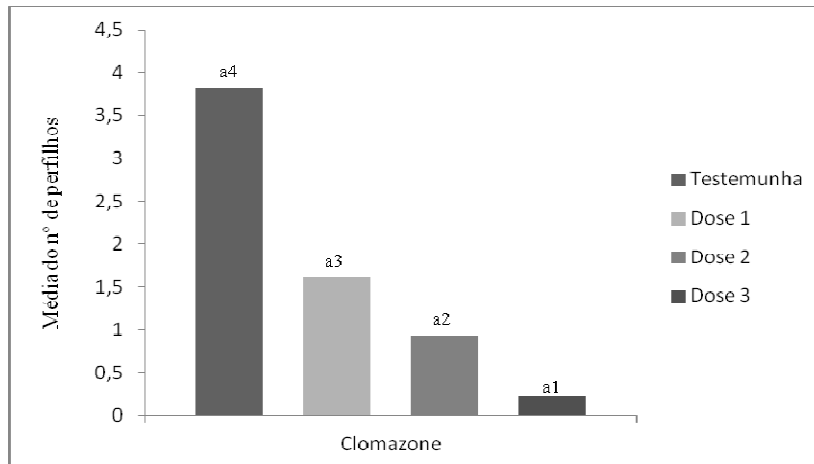


Figura 40. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

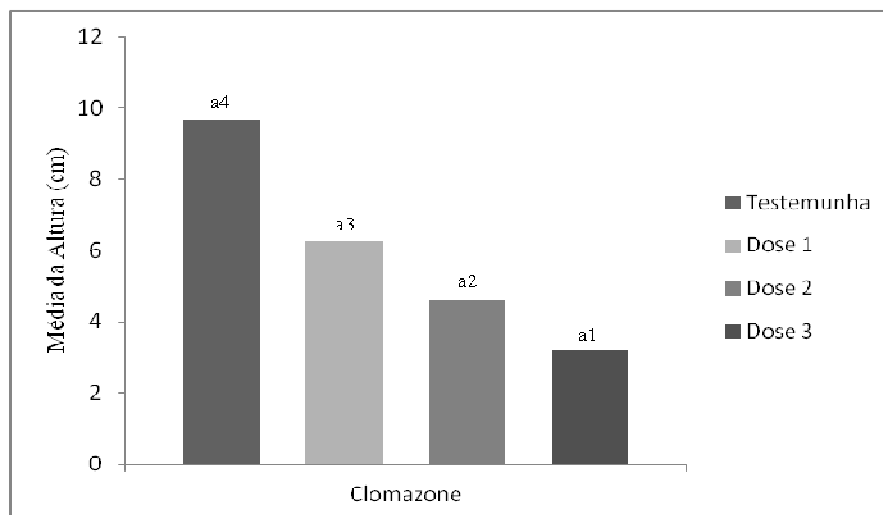


Figura 41. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Clomazone na análise de variância da altura aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Avaliando-se as notas de sintomas de fitotoxicidade (Figura 42), aos 21 DAT a variedade RB951541 diferiu de todas as demais sendo a mais sensível ao tratamento, as variedades e clones não diferiram entre si, apresentando maior tolerância. Em relação a característica número de perfilhos (Figura 43), observou-se maior tolerância da variedade RB98710, distinguindo-a das demais. A variedade RB951541 apresentou maior sensibilidade ao tratamento com o herbicida clomazone, tendo ocorrido a morte das plantas submetidas a todas as doses. Para a característica altura as variedades/clones RB979088, RB98710,

RB966928 e SP79011 não diferiram entre si, apresentando os maiores valores de altura de plantas, a que apresentou menor altura foi a RB951541, igualmente como nas outras características, foi a mais suscetível ao tratamento (Figura 44).

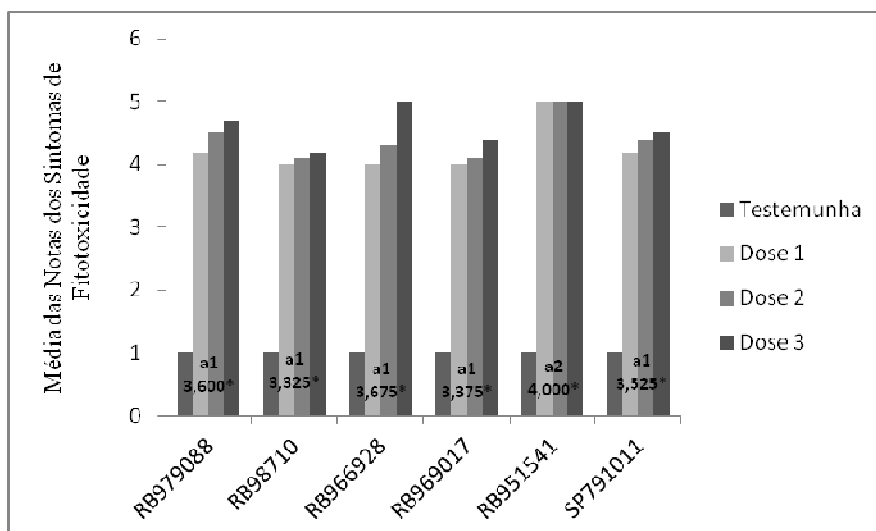


Figura 42. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro* submetidas a aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

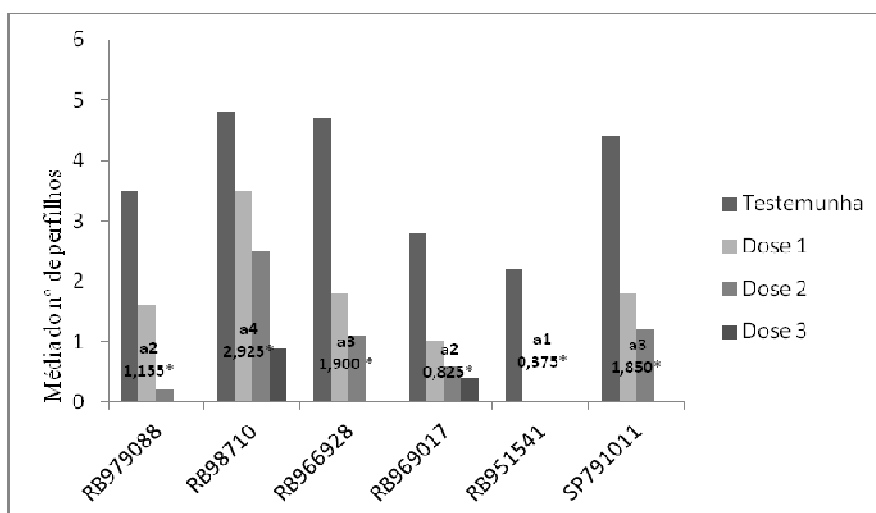


Figura 43. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro* submetidas à aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

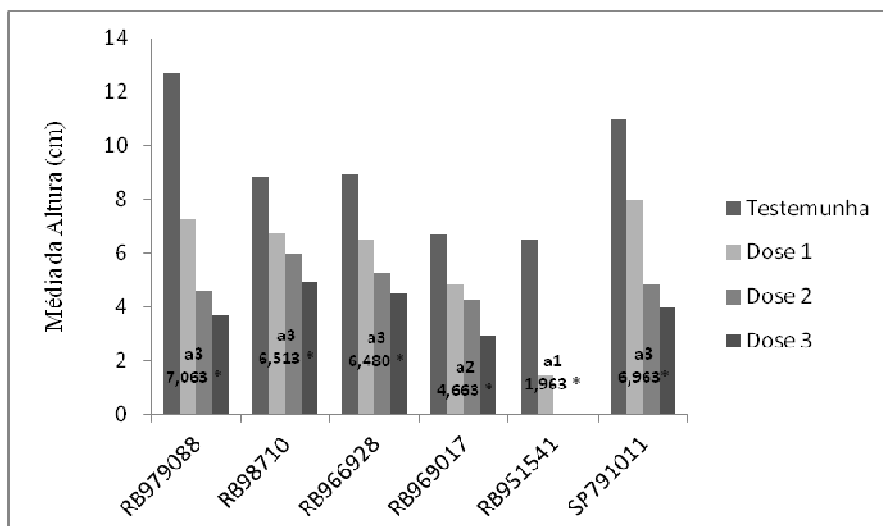


Figura 44. Média da altura (cm) aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro* submetidas a aplicação do herbicida Clomazone. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pode-se constatar que para o tratamento com o herbicida clomazone, com plantas micropropagadas, na fase de aclimação, a variedade RB951541 diferiu das demais como a mais sensível ao herbicida e a que se destacou como mais tolerante em todas as características foi a RB98710 seguida das variedades/clones RB979088, RB966928 e SP79011.

FERREIRA et al. (2010) em experimento utilizando mudas de cana-de-açúcar micropropagadas na fase de aclimação também distinguiu variedades, sendo que a SP87-344 foi a mais sensível à aplicação de herbicidas, particularmente ao herbicida clomazone, através dos menores valores de altura de plantas.

NEGRISOLI et al. (2004) constatou que os herbicida clomazone, aplicado em doses representativas às utilizadas comercialmente, foi seletivo à cana-de-açúcar RB855113, não afetando seu crescimento e sua produtividade até 40 dias após aplicação.

4.2.2 Tolerância ao Herbicida MSMA

Os resultados com o herbicida MSMA *ex vitro*, para as características de número de perfilhos, notas de sintomas de fitotoxicidade e altura, a dose 1 em todas as características diferiu da testemunha (Figuras 45, 46 e 47).

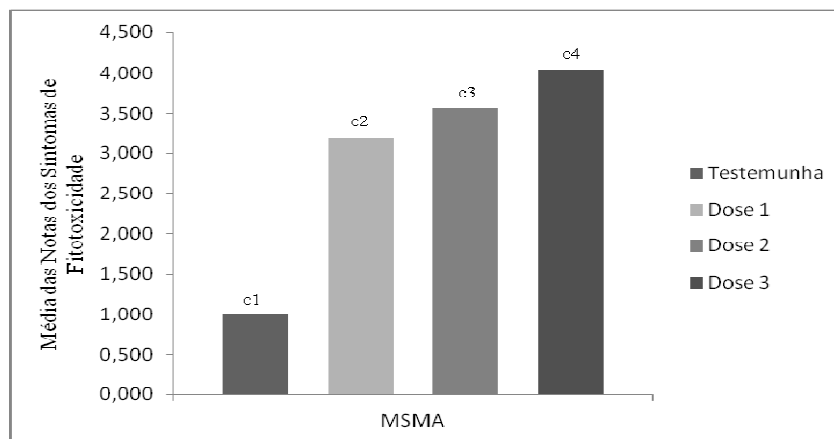


Figura 45. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

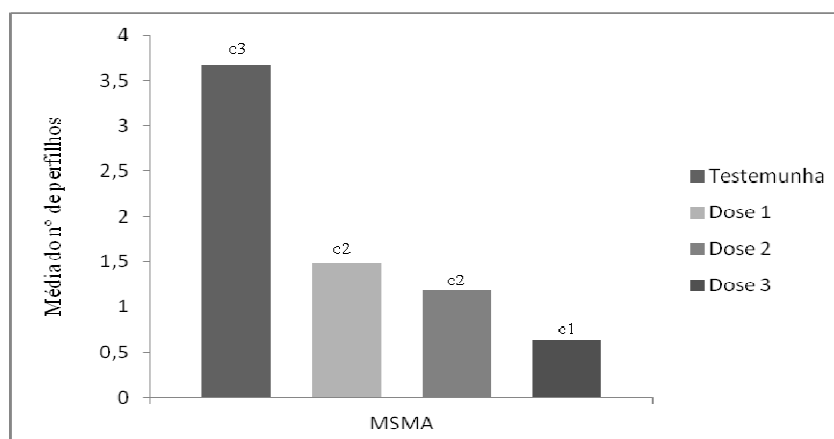


Figura 46. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

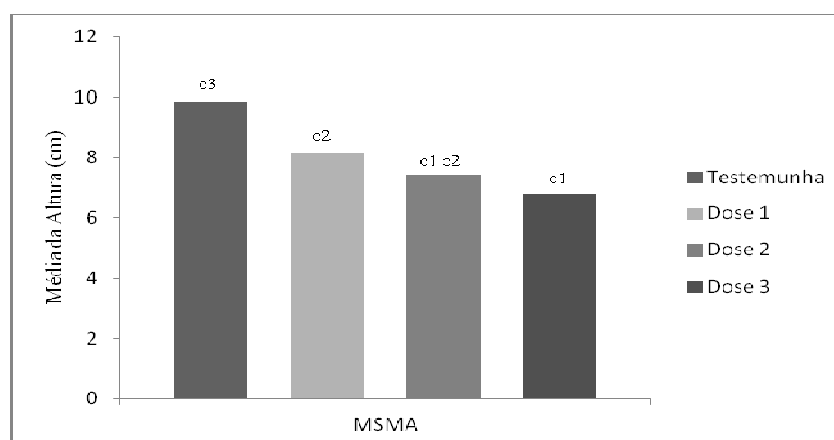


Figura 47. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida MSMA na análise de variância da altura aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando o comportamento das notas dos sintomas de fitotoxicidade, as variedades/clones: RB979088, RB98710, RB966928, RB969017 e RB951541 não diferiram entre si, apresentando os maiores sintomas de fitotoxicidade. A SP79-1011 apresentou os menores sintomas, sendo a mais tolerante ao tratamento (Figura 48).

As variedades caracterizadas de sensíveis ao tratamento por apresentar alta média de notas na análise dos sintomas de fitotoxicidade e mesmo assim tiveram um alto número de perfilhos, segundo FERREIRA *et al* (2010) que avaliaram a característica número de perfilhos, em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, submetidas a tratamentos com herbicida para distinguir variedades tolerantes, o fato das plantas que sofreram danos devido ao tratamento com herbicidas terem um alto número de perfilhos, pode estar relacionado com a ocorrência de danos ou morte nos perfilhos primários e, conseqüentemente, estímulo à emissão de grande número de novos perfilhos.

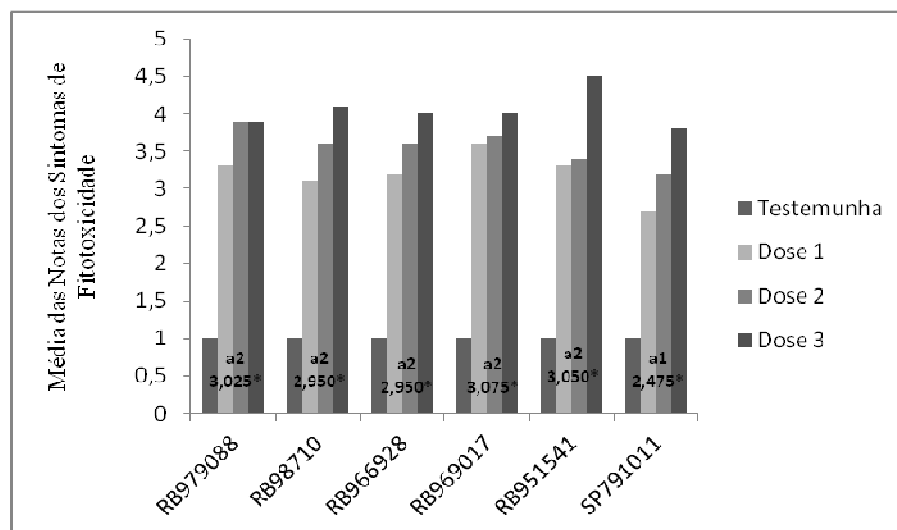


Figura 48. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro* submetidas a aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As variedades RB966928, RB98710 e SP79-1011 não diferiram entre si apresentando maior número de perfilhos e maior tolerância ao tratamento. Devido a morte das plantas na dose 3, o clone RB969017 apresentou menor média do número de perfilhos, destacando-se das demais como o mais sensível ao tratamento (Figura 49).

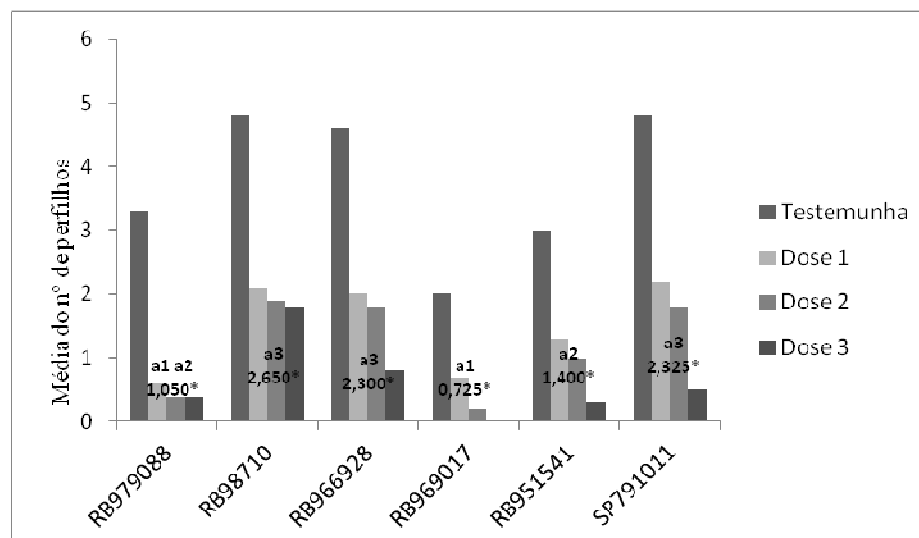


Figura 49. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro* submetidas à aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise da altura das plantas submetidas ao tratamento com o herbicida MSMA (Figura 50), a RB951541 apresentou menor tamanho não diferindo da RB969017. A RB979088 não diferiu da RB966928 apresentando maior média de altura, porém a RB966928 também não diferiu da SP79-1011 enquadrando essas três variedades como as mais tolerantes de acordo com a característica altura.

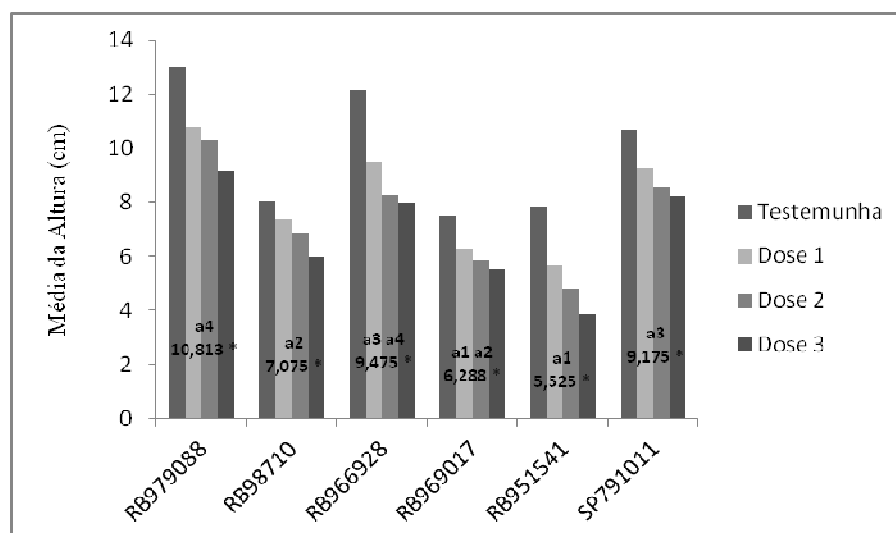


Figura 50. Média da altura (cm) aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro* submetidas a aplicação do herbicida MSMA. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pode-se observar, que a variedade RB966928 apesar de apresentar os maiores valores das notas de sintomas de fitotoxicidade, distingui-se no número de perfilhos e altura,

mostrando que o tratamento com o herbicida resultou em sintomas visuais, porém não alterou as demais características avaliadas, com isso, podemos dizer que a RB966928 e a SP79-1011 foram as que mais destacaram-se na tolerância ao herbicida MSMA. A RB969017 e a RB951541 foram as variedades que mostraram maior sensibilidade ao tratamento com o herbicida na fase de aclimação. Os sintomas visuais ocasionados pelo herbicida MSMA podem ter ocorrido devido a falta de clorofila, já que no trabalho de FERREIRA et al. (2010) foi observado que na variedade SP80-3280 o tratamento com o herbicida MSMA, ocasionou forte diminuição no teor de clorofila.

4.2.3 Tolerância ao Herbicida Diuron e Hexazinona + Diuron

No experimento *ex vitro* realizado com os herbicidas diuron e hexazinona + diuron, todas as variedades analisadas foram altamente sensíveis à esses herbicidas, resultando na morte de todas as plantas aos 21 DAT, em todas as doses do tratamento (Figuras 51, 52, 53, 54, 55 e 56).

No estudo de FERREIRA *et al* (2010), a aplicação de diuron + hexazinone sobre SP80-3280 resultou na mais expressiva inibição de crescimento dentre as variedades, com os menores índices de altura e biomassa.

Esse acontecimento pode ter sucedido devido as plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, ainda estarem na fase de aclimação. Sabe-se que as plantas *in vitro* possuem um aparelho fotossintético ineficiente, além de redução no número de estômatos e mal funcionamento no mecanismo de abertura e fechamento estomático (BAKER, 1974; SUTTER & LANGHANS, 1980), a fase de aclimação é essencial para a recuperação gradativa do funcionamento do aparato fotossintético, antes pouco ativo. Tanto o diuron quanto o hexazinona + diuron, são herbicidas com mecanismo de ação de inibição da fotossíntese (CHRISTOFFOLETI, 1997), portanto, quando as plantas micropropagadas na fase de aclimação, foram submetidas à aplicação desses herbicidas, não resistiram em nenhuma dose.

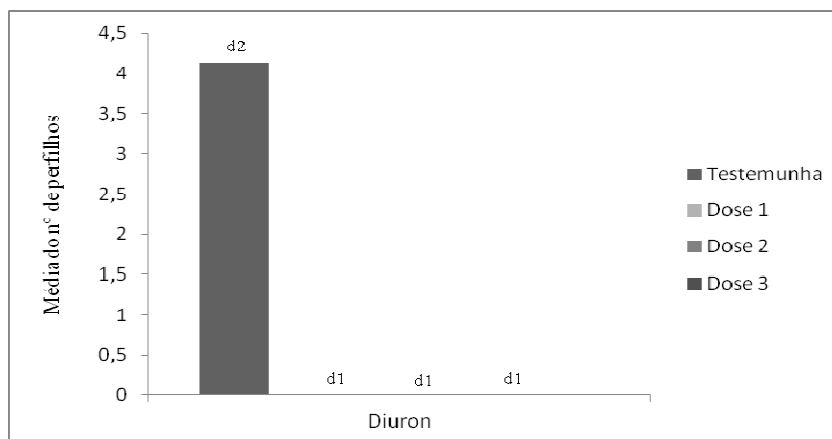


Figura 51. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

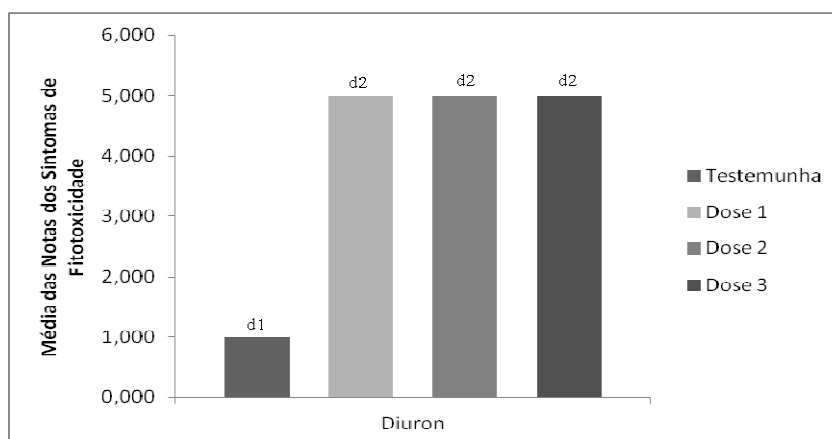


Figura 52. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

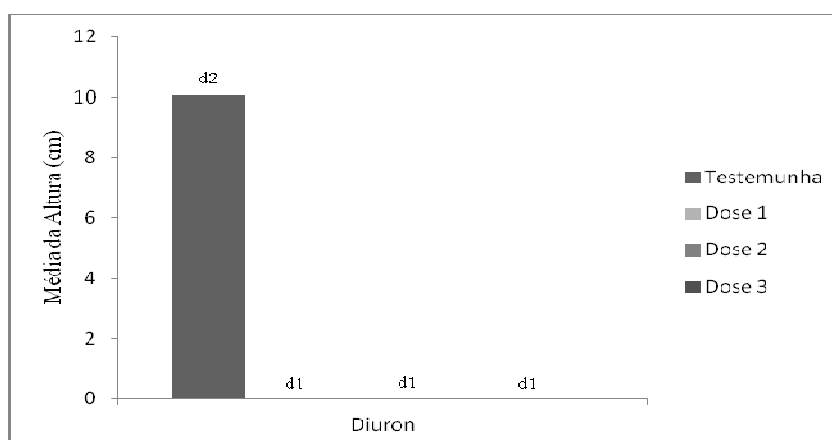


Figura 53. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Diuron na análise de variância da altura aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

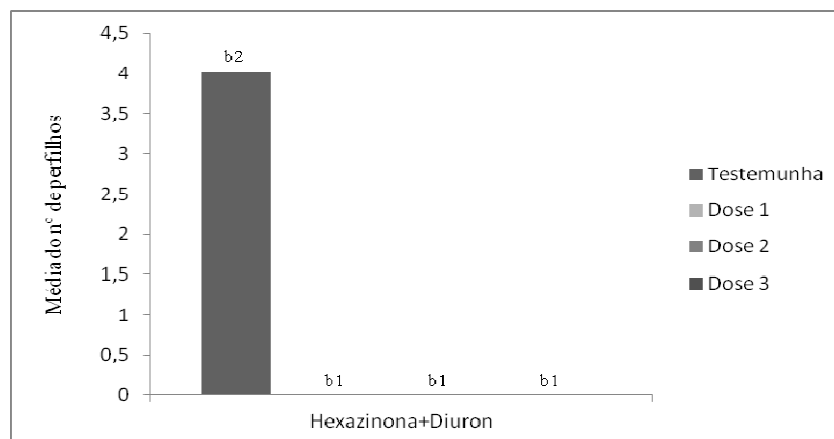


Figura 54. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Hexazinona + Diuron na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

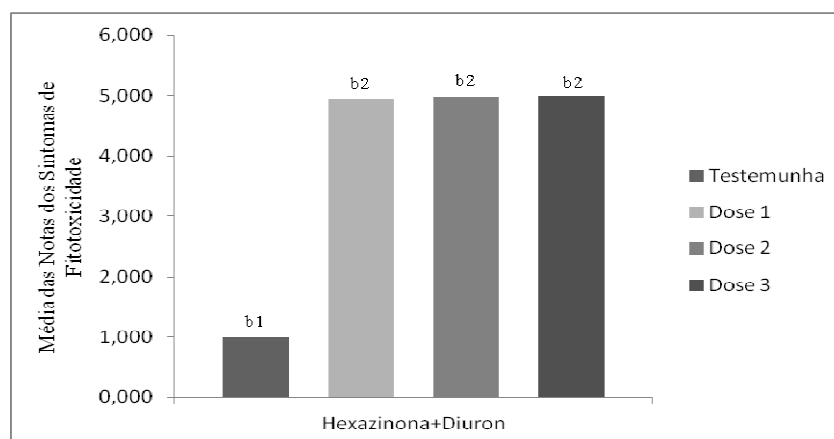


Figura 55. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Hexazinona + Diuron na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 56. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida Hexazinona + Diuron na análise de variância da altura aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2.3 Tolerância ao Herbicida 2,4-D

As avaliações das características de variedades de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, observando a tolerância ao herbicida 2,4-D, mostrou que para distinguir as plantas tratadas das não tratadas, a dose 1 já foi suficiente para todas as características avaliadas aos 21 DAT (Figuras 57, 58 e 59).

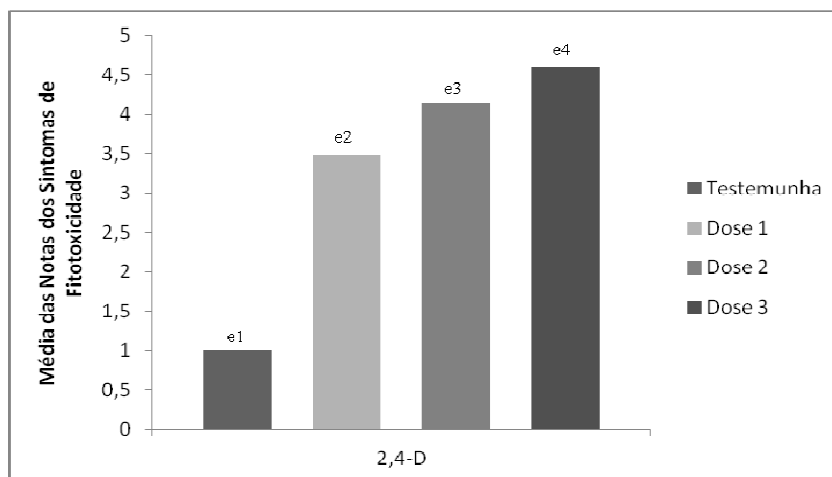


Figura 57. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida 2,4-D na análise de variância das notas dos sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

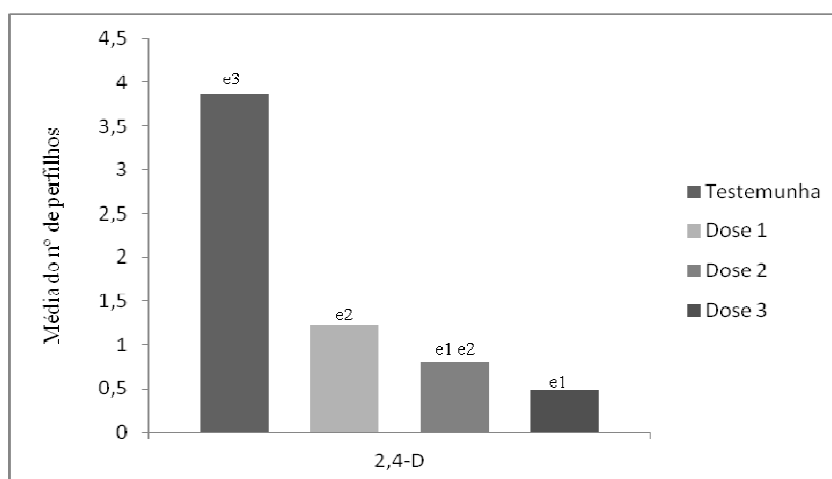


Figura 58. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida 2,4-D na análise de variância do número de perfilhos aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar no sistema *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

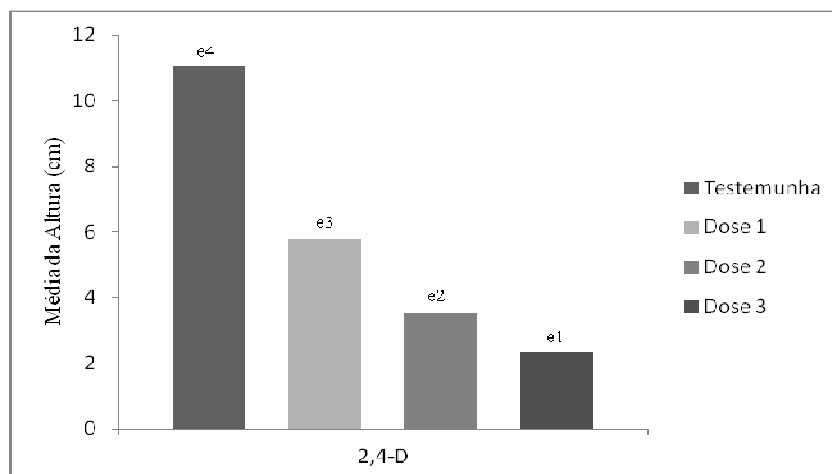


Figura 59. Média do desdobramento das doses em relação ao herbicida 2,4-D na análise de variância da altura aos 21 dias após o tratamento de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro*. Colunas com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a característica sintomas de fitotoxicidade, assim como na avaliação do número de perfilhos as variedades/clones RB98710 e SP79-1011 foram as que apresentaram maior tolerância distinguindo-se das demais. As variedades RB979088, RB966928, RB969017 e RB951541 foram as mais sensíveis ao 2,4-D (Figura 60).

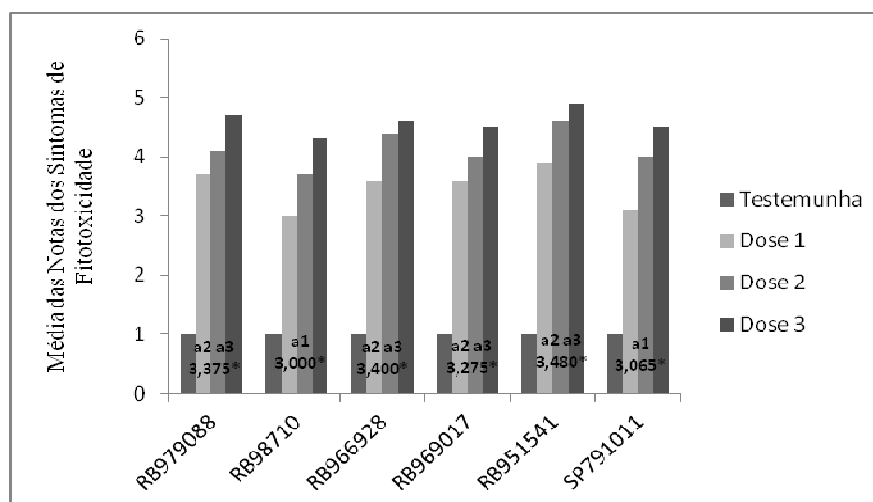


Figura 60. Média das notas de sintomas de fitotoxicidade aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro* submetidas a aplicação do herbicida 2,4 - D. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O resultado para o número de perfilhos evidencia as variedades RB98710 e SP79-1011 como as mais tolerantes ao tratamento, as variedades/clones RB979088, RB966928, RB969017 e RB951541 não diferiram entre si sendo as mais sensíveis (Figura 61).

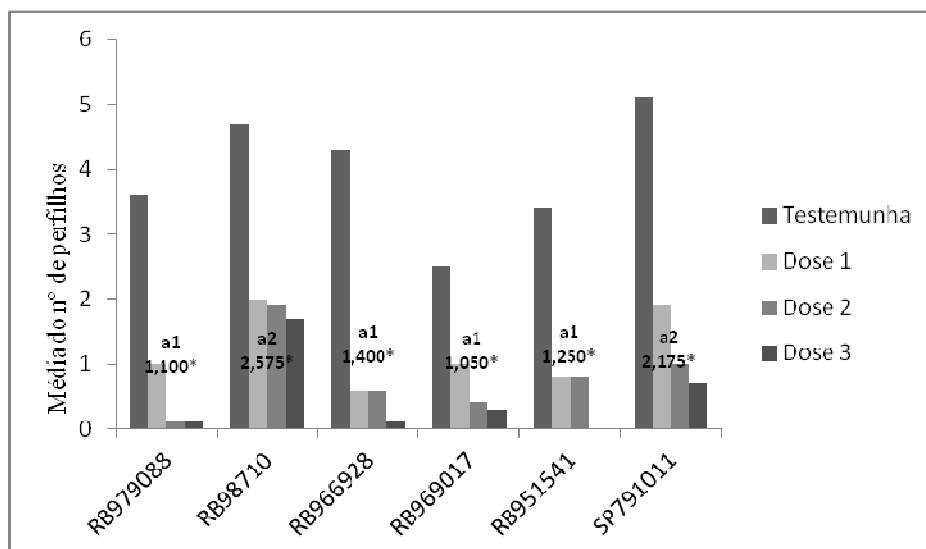


Figura 61. Média do número de perfilhos aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro* submetidas a aplicação do herbicida 2,4 - D. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observando-se a altura das plantas, podemos verificar a maior tolerância das variedades/clones RB979088, RB98710, RB966928 e SP79-1011 apesar de não apresentarem médias significativamente diferentes, essas variedades se distinguiram da RB969017 e da RB951541 que foram as mais sensíveis ao tratamento (Figura 62).

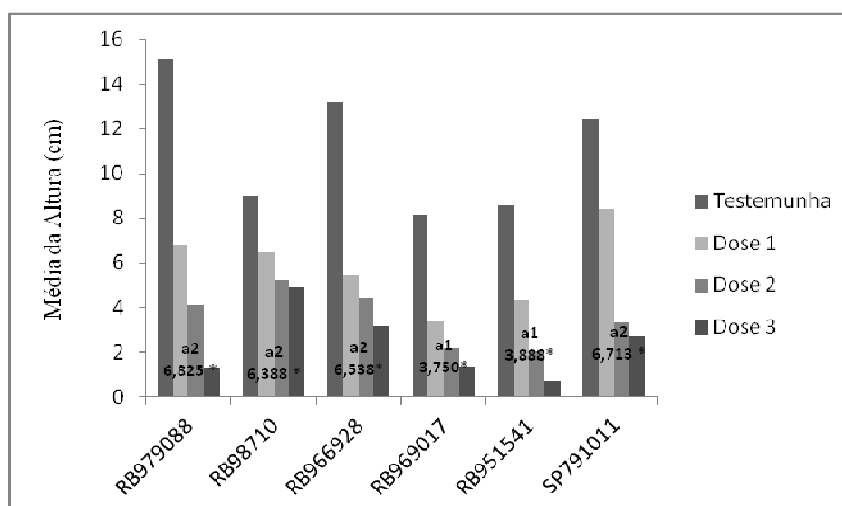


Figura 62. Média da altura (cm) aos 21 dias de variedades de cana-de-açúcar em condições *ex vitro* submetidas à aplicação do herbicida 2,4 - D. Médias com letra seguida do mesmo número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conseqüentemente pode-se indicar que para o experimento *ex vitro*, as variedades RB98710 e SP79-1011 foram as mais tolerantes a aplicação do herbicida 2,4-D. De forma oposta, a RB969017 e a RB951541 apresentaram-se como as mais sensíveis.

No trabalho de FERREIRA et al (2010) em nenhuma das 7 variedades SP analisadas foram observadas alta sensibilidade ao herbicida 2,4-D.

5. CONCLUSÕES

5.1 Experimento *in vitro*

Para a avaliação da tolerância de variedades de cana-de-açúcar em cultivo *in vitro* aos herbicidas clomazone e diuron, as menores doses utilizadas 1,0 kg i.a./ha e 2,4 kg i.a./ha respectivamente permitem a distinção para as características notas de sintomas de fitotoxicidade, número de perfilhos e peso da matéria seca.

Quanto ao herbicida MSMA essa distinção de doses é observada na característica notas dos sintomas de fitotoxicidade e peso de matéria seca.

A variedade RB951541 mostra-se a mais sensível em face a todos os herbicidas em todas as análises.

Os resultados mostram a possibilidade da aplicação dessa metodologia para a avaliação precoce da tolerância de clones e variedades de cana-de-açúcar aos herbicidas.

As avaliações das características peso da matéria seca e notas dos sintomas de fitotoxicidade apresentam melhor eficiência para a distinção da tolerância das variedades aos tratamentos.

5.2 Experimento *ex vitro*

As avaliações do experimento com plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, submetidas a doses de herbicidas na fase de aclimação, resultaram na indicação de 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) e da dose 1 dos herbicidas como os mais indicados para a diferenciação das variedades/clones.

Para o tratamento com o herbicida clomazone, as variedades RB98710, RB979088, RB966928 e SP79-1011 distinguiram-se como tolerantes e a variedade RB951541 como a mais sensível.

Em relação ao MSMA, as variedades RB966928 e SP79-1011 mostraram-se tolerantes ao herbicida. O clone RB969017 e a variedade RB951541 foram as que apresentaram maior sensibilidade.

A metodologia proposta nas doses utilizadas não se mostrou eficiente para a seleção de variedades/clones de cana-de-açúcar quanto à tolerância aos herbicidas diuron e hexazinona + diuron, pois esses herbicidas causaram a morte das plantas em todas as doses.

Na análise do tratamento com o herbicida 2,4-D, as variedades RB98710 e SP79-1011 foram as mais tolerantes. Diferentemente, o clone RB969017 e a variedade RB951541 foram os mais sensíveis.

A variedade RB951541 diferiu das demais variedades nos dois experimentos, sendo a mais sensível sobre todos os aspectos e em todos os tratamentos, as duas metodologias detectaram a mesma sensibilidade dessa variedade.

O mesmo ocorreu na distinção das variedades tolerantes, apesar do experimento *ex vitro* ter mais variedades e herbicidas, o herbicida clomazone, que apresentou resultados conclusivos em ambos os experimentos, indica que as variedades RB966928 e SP79-1011 seguindo as particularidades de cada experimento, destacaram-se tolerantes em ambos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como o presente trabalho apresentou metodologias novas, maiores estudos precisam ser desenvolvidos para consolidar as metodologias de diferenciação precoce da tolerância de variedades de cana-de-açúcar a herbicidas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERHATHY, J.R. **Mode of action of pigment inhibitors**. West Lafayette: Purdue University, 1994, p.285-296.

AMARANTE, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. **Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação**. Rev. Quim. Nova, v. 25, n. 4, 589-593, 2002.

ANVISA. **Mercado de Agrotóxicos e Regulação**. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b064b7804c1890a395ccd5dc39d59d3e/Semin%C3%A1rio+ANVISA+Mercado+e+Regula%C3%A7%C3%A3o+de+Agrot%C3%B3xicos+2012+%5BSomente+leitura%5D.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2012.

ARANTES, M.T.; SILVA, M.A.; PINCELLI, R.P.; RHEIN, A.F.L.; DELLABIGLIA, W.J.; BASSETTO, S.C. **Avaliações morfológicas em variedades de cana-de-açúcar submetidas a herbicidas seletivos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27, Ribeirão Preto: SBCPD, 2010.

ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; AMÂNCIO, A.V.; CORREA, R.M.L.; GUERCIO, M.A. **Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica**. Rev. Quim. Nova, v. 28, n. 6, 2005.

ASSIS, T.F. de; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/EmbrapaCNPB, 1998, p. 261-296.

ATANOR; DOW AGROSCIENCES; MILENIA; NUFARM. **Perfil técnico Força Tarefa 2,4-D**. Brasil, 2010. Disponível em: <<http://www.24d.com.br/br/estudos/01-PerfilTecnico24-D.pdf>>. Acesso em: 08 de agosto de 2011

AUGUSTO, R. **Avaliação da adaptabilidade e estabilidade fenotípica em genótipos de cana-de-açúcar, série RB96**. Maringá: UEM, 2009, 66p.

BACHIEGA, A.L.; SOARES, J.E. **Callisto (mesotrione) - Novo herbicida para o controle de plantas daninhas em pós-emergência, na cultura do milho**. Londrina: SBCPD/Embrapa Clima Temperado, 2002, 655p.

BARBOSA, G.V.S.; SOUZA, A.J.R.; ROCHA, A.M.C.; SANTOS, A.V.P.; RIBEIRO, C.A.G.; BARRETO, E.J.S.; MOURA, G.; SOUZA, J.L.; FERREIRA, J.L.C.; SOARES, L.; CRUZ, M.M.; FERREIRA, P.V.; SILVA, W.C.M. **Três Novas Variedades RB de Cana-de-Açúcar**. Maceió: Boletim técnico PMGCA n.2, 2003, 16p.

BARBOSA, M. H. P.; SILVEIRA, L. C. I. **Cana-de-açúcar: variedades, estabelecimento e manejo**. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DE PASTAGEM, 3., 2006, Viçosa. Anais...Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p.245-276

BAKER, E.A. **The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea* var. *gemmifera***. *New Phytol.*, 73:955-966, 1974.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento **Bula herbicida Karmex**. Brasília, DF, 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/KARMEX.pdf>>. Acesso em: 19 de janeiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento **Bula herbicida MSMA720**. Brasília, DF, 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/MSMA720.pdf>>. Acesso em: 19 de janeiro de 2013.

BLANCO, F.M.G. **Controle das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**. Campinas, 2003. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IX_RIFIB/blanco.PDF>. Acesso em: 12 de janeiro de 2013

BOWER, R.; BIRCH, R. G. **Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment**. Oxford: The Plant Journal, v. 2, n. 3, p. 409-416, 1992.

CARVALHO, V.; VEIGA, C.F.M. **Curso Cultura de Tecidos Vegetais**. Seropédica: UFRRJ, 2011, 59p.

CARVALHO, L.B. **Herbicidas**. Editado pelo autor. Lages: SC, 2013, 62p.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília, Embrapa-Informação Tecnológica, 2004, p. 31-47.

CHRISTENSEN, A. H.; QUAIL, P. H. **Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants**. London: Transgenic Research, v. 5, n. 3, p. 213-218, 1996.

CHRISTOFFOLETI, P.J. **Resistência de plantas daninhas aos herbicidas**. In: Simpósio Sobre Herbicidas e Plantas Daninhas. Dourados: EMBRAPA, 1997, p.75-94.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; CORTEZ, M.G.; MONQUEIRO, P.A. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE MANEJO E CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS EM PLANTIO DIRETO, 3., 2001, Passo Fundo. **Resumo das Palestras...** Passo Fundo: Aldeia Norte, 2001. p..39-53.

CHRISTOFFOLETI, P.J. **Reflexão sobre o histórico da evolução da ciência das plantas daninhas**. Piracicaba: ESALQ, 2008, 11p.

CHRISTOFFOLETI, P.J. **O melhor Herbicida**. São Paulo: Rev. Alcoolbras, ed.136, 2012.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S. J. P. **Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar: novas moléculas de herbicidas**. Disponível em: <<http://www.ppi-far.org/Anais%20Jacob%.com.br>>. Acesso em: 18 de setembro de 2012.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; OVEJERO, R.F.; NICOLAI, M., VARGAS, L.V., CARVALHO, S.J.P., CATANEO, A.C., CARVALHO, J.C., MOREIRA, M.S. **Aspecto de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas, 2008, 120p.

CID, L.P.B. **A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso?** Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. vol.3 no.19, Brasília, 2001.

CID, L.P.B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 2010, 303p.

CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O., DUARTE, A.C.; MARTINS, G.S., MANSUR, E. **Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.41, n.3, p.385-391, 2006.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento – Censo Varietal**. Brasília: CONAB, 2011. Disponível em: <www.ridesa.com.br/censo_varietal_2011.xls>. Acesso em: 10 de dezembro de 2012.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento – Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar, Levantamento de Dezembro de 2012**. Brasília: CONAB, 2012, 18p.

CONSTANTIN, J. **Avaliação da seletividade do herbicida halosulfuron à cana-de-açúcar**. 1997. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 1997.

CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA, R.S.; INOUE, M.H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011, 320p.

CORRÊA, T.M. **Parecer técnico FAMATO**. Cuiabá: Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Mato Grosso, 2010. Disponível em: < <http://www.sistemafamato.org.br/site/>>. Acesso em: 18 de abril 2011

COSTA, D.A. **Aspectos Fisiológicos da Cana-de-Açúcar sob o Cultivo *in vitro* em Diferentes Microambientes**. 82f. 2012. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S. J. P.; CATANEO, A. C.; CARVALHO, J. C.; MOREIRA, M. S. **Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas**. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas – HRAC-BR, 2008, 120p.

CRUZ, M.A.L., SILVA, A.D.C., VEIGA, C.F.M., SILVEIRA, V. **Biofábricas para a produção de mudas por micropropagação: estratégia para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar no Rio de Janeiro**. Revista Científica Internacional, v.2, n.05, 2009.

DAS, A. C.; DEBNATH, A.; MUKHERJEE, D. **Effect of the herbicides oxadiazon and oxyfluorfen on phosphates solubilizing microorganisms and their persistence in rice fields**. Chemosphere, v.53, p.217–221, 2003.

DAROS, E.; BESPALHOK, J.C.; ZAMBON, J.L.C.; IDO, O.T.; OLIVEIRA, R.A.; RUARO, L.; WEBER, H. **RB966928 – Early maturing sugarcane cultivar**. Brasil, 2010. Disponível em: <<http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/uploads/c8eb9792-c36f-6a51.pdf>>. Acesso em: 08 de janeiro de 2013.

DONATO, V.M.T.; ANDRADE, A.G.; TAKAKI, G.M.C.; MARIANO, R.L.R.; MACIEL, G.A. **Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos**. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 29, n. 1, p. 134-141, 2005.

DURIGAN, J.C.; TIMOSSI, P.C.; LEITE, G.J. **Controle químico da tiririca (*Cyperus rotundus*), com e sem cobertura do solo pela palha de cana-de-açúcar**. Planta Daninha, v.22, p.127-135, 2004.

EMBRAPA. **Produção de sementes sadias de feijão comum em várzeas tropicais**. EMBRAPA, 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoVarzeaTropical/glossario.htm>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2013.

EMBRAPA. **Embrapa obtém primeiras plantas transgênicas de cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2011. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2011/maio/4a-semana/embrapa-obtem-primeiras-plantas-transgenicas-de-cana-de-acucar/>>. Acesso em: 02 de dezembro de 2011.

EPAMIG. **Recomendações Técnicas para o Cultivo da Cana-de-Açúcar**. Minas Gerais: EPAMIG, 2010, 4p.

FAGLIARI, J.R.; OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J. **Métodos de avaliação da seletividade de herbicidas para a cultura da cana-de-açúcar**. Acta Scientiarum, v.23, n.5, p.1229-1234, 2001.

FAO. **Food and Agricultural Organization Stats – Sugar Cane 2010**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 22 de outubro de 2011.

FAUSTO, B. **História do Brasil**. São Paulo: EDUSP, 1996, 89p.

FENG, P. C.C. **Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean**. Proc. Natl. Acad. Sci., v.102, n.48, p.17290-17295, 2005.

FERNANDES, O.W.B. **Avaliação de Variedades de Cana-de-Açúcar para a Produção de Cachaça Artesanal e a Interferência dos Resultados no Comportamento do Produtor na Região de Salinas-MG: Uma Contribuição Extensionista**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2005, 78p.

FERREIRA, D.F. 1992. **SISVAR - Sistema para análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 79p.

FERREIRA, E. A. **Sensibilidade de variedades de cana-de-açúcar à mistura trifloxysulfuron-sodim + ametryn**. Planta Daninha, v. 23, n. 1, p. 93-99, 2005.

FERREIRA, E.A.; SILVA, A.A.; FERREIRA, L.R. **Mecanismos de ação de herbicidas**. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2005, Salvador. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/336.pdf>. Acesso em: 19 de janeiro de 2013.

FERREIRA, R.R.; OLIVEIRA, F.T.R.; DELITE, F.S.; AZEVEDO, R.A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; FIGUEIRA, A.V.O. **Tolerância diferencial de variedades de cana-de-açúcar a estresse por herbicidas**. Bragantia: Campinas, vol.69, no.2, 2010.

FEVEREIRO, Manuel P.; CAETANO, Helena V.; SANTOS, Maria G. **Cadernos didáticos de Ciências, vol 1**. Lisboa: Ministério da Educação, DES, EEC, 2001.

FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC, G. **Photosynthesis, leaf conductance and water relations of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization**. *Physiol. Plant.* v.102, p.411-418, 1998.

FMC CORPORATION. **Bula herbicida GAMIT**. Brasil, 2011. Disponível em: <<https://www.fmcagricola.com.br/produtosdetalhes.aspx?cod=46>>. Acesso em: 17 de setembro de 2012.

GALON, L. **Tolerância de Genótipos de Cana-de-Açúcar a Herbicidas**. 2008. 87f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa: Viçosa.

GALLAHER, K.; MUELLER, T.C. **Effect of crop presence on persistence of atrazine, metribuzin, and clomazone in surface soils**. *Weed Sci.*, v.44, 1996, p.698-703.

GERALD, L.T.S. **Biofábrica de plantas : produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua, 2011, 490p.

GIOLO, F.P.; GRÜTZMACHER, A.D.; PROCÓPIO, S.O.; MANZONI, C.G.; LIMA, C.A.B.; NÖRNBERG, S.D. **Seletividade de formulações de glyphosate a *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. *Planta Daninha*, v.23, p.457-462, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e Aplicações de Cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP: EMBRAPA CNPHortaliças, 1990, p.99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. J. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA SPI/CNPH, 1998, v. 1, p. 183-260

GUERRA, M.P., NODARI R.O. **Introdução ao Conceito de Biotecnologia**. Florianópolis: UFSC/LFDGV, 2006, 41p.

HAZARIKA, B. N. **Acclimatization of tissue-cultured plants**. *Current Science*, v.85, n. 12, p.1704-1712, 2003.

HRAC. **Resistência de Plantas Daninhas à Herbicidas**. Piracicaba: HRAC - Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas, 1999, 32p.

IDEA. **Características Agronômicas mais Marcantes das Principais Variedades de Cana da Região Centro-Sul.** Ribeirão Preto, 2004. Disponível em: <http://www.agrobyte.com.br/index.php?pag=cana&cana=variedade_cana>. Acesso em: 04 de janeiro de 2013.

IDEA. **Irrigação e manejo varietal são as soluções para o Nordeste.** Ribeirão Preto, 2011. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1078397#nc>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2011.

INDA. **Instituto Nacional dos distribuidores de aço – O Espaço Sucroalcooleiro.** 2012. Disponível em: < <http://www.inda.org.br/revista/139/139.pdf> >. Acesso em: 13 de outubro de 2012.

JALAJA, N.C.; NEELAMATHI, D.; SREENIVASAN, T.V. **Micropropagation for Quality Seed Production in Sugarcane in Asia and The Pacific.** Bangkok: Asia Pacific Association of Agricultural Research Institutions , 2008, 46p.

KAIZU, Y.; OKAMOTO, T.; IMOU, K. **Shape recognition and growth measurement of micropropagated sugarcane.** Agricultural Engineering International e Journal, Manuscript, v.4, 2002.

KIRKSEY, K.B.; HAYES, R.M.; KRUGER, W.A.; MULLINS, C. A.; MUELLER, T.C. **Clomazone dissipation in two Tennessee soils.** Weed Sci., v.44, 1996, p.959-963.

KRUSE, N.D. Inibidores da síntese de carotenóides. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO JÚNIOR, A. (Ed.). **Herbicidologia.** Porto Alegre, 2001, p.131-122.

KUVA, M.A. **Períodos de interferencia das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. Capim-brachiaria (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*).** Planta Daninha, v.21, n.1, p-37-44, 2003.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; RODRIGUES, A. A.; CRUZ, G. M.; BATISTA, L. A. R.; FIGUEIREDO, P.; SILVA, M. A.; BIDOIA, M. A. P.; ROSSETTO, R.; MARTINS, A. L. M., GALLO, P. B.; KANTHACK, R. A. D.; CAVICHIOLI, J. C.; VASCONCELOS, A. C. M.; XAVIER, M. A. **A variedade IAC86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal.** Campinas: Boletim Técnico IAC, 2002. n. 193, 36p.

LANDELL, M. G. A.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; VASCONCELOS, A. C. M.; PINTO, L. R.; CRESTE, S. Desenvolvimento e critérios de manejo de variedades. In: RIPOLI, T.C. C. P.; CASAGRANDE, D. V.; IDE, B. Y. **Plantio de cana-de-açúcar: Estado da arte.** Piracicaba: TCC, 2006, v. 1, p.163-172.

LEE, T.S.G.; BRESSAN, E.A.; SILVA, A.D.C.; LEE, L.L. **Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos.** Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, Campinas, v.16, 2007.

LERCARI, B.; MOSCATELLI, H. A.; GHIRARDI, E.; NICEFORO, R.; BERTRAM, L. **Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and light-grown hypocotyls of tomato.** Plant Sci., 140:53-64, 1999.

LORENZI, H. **Plantas daninhas e seu controle na cultura da cana-de-açúcar.** Piracicaba: COPERSUCAR, 1988, p.281-301.

LORENZI, H. **Plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar: Plantas daninhas na lavoura do nordeste brasileiro.** In: ENCONTRO TÉCNICO GOAL, CANA-DEAÇÚCAR, 1995, Recife. Anais... Recife: 1995.

LPFD. **Laboratório de Produtos Fermento Destilados – Cana-de-Açúcar.** Paraíba, 2013. Disponível em: <http://www.ct.ufpb.br/laboratorios/lpfd/index.php?option=com_content&view=article&id=55&Itemid=55>. Acesso em: 18 de janeiro de 2013.

MAGRO, F.J.; TAKAO, G.; CAMARGO, P.E.; TAKAMATSU, S.Y. **Biometria em cana-de-açúcar.** Piracicaba: ESALQ, 2011, 18p.

MALHOTRA, S.D. **Biotechnology and sugarcane.** International Sugar Journal, v.97, p.160-163, 1995.

MARIN, F.R. **Pré-Produção Características de Variedades.** Brasília: Embrapa, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html>. Acesso em: 13 de outubro de 2012.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoria da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005, p. 225-274.

MILENIA AGROCIÊNCIAS. **Bula herbicida Aminol.** Brasil, 2008. Disponível em: <<http://www.milenia.com.br/products.php>>. Acesso em: 18 de setembro de 2012.

MOLINARI, H.B.C. **Embrapa desenvolve cana modificada geneticamente para resistir à seca.** São Paulo, 2012. Disponível: <http://www.revistaalcoholbras.com.br/edicoes/ed_136/mc_1.html>. Acesso em: 08 de janeiro de 2013.

MORELAND, D.E. **Mechanisms of action of herbicides.** Annual review. Plant Physiology, Rockville, 1980, 610p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. **A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures.** Plant Physiol, v.15, 1962, p.473-479.

NEGRISOLI, E.; VELINI, E. D. TOFOLI, G. R.; CAVENAGHI, A. L.; MARTINS, D.; MORELLI, J. L. ; COSTA, A. G. F. **Seletividade de herbicidas aplicados em pré-emergência na cultura de cana-de-açúcar tratada com nematocidas.** Planta Daninha, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 567 575, 2004.

NIMBAL, C.I.; SHAW, D.R.; WILLS, G.D.; DUKE, S.O. **Environmental effects on MSMA phytotoxicity to wild-type and arseniacal herbicide-resistant common cocklebur (*Xanthium strumarium*)**. Weed Technology, v.10, n.4, p.809-814, 1996.

NOLDIN, J.A.; HERMES, L.C.; FAY, E.F.; EBERHARDT, D.S.; ROSSI, M.A. **Persistência do herbicida clomazone no solo e na água quando aplicado na cultura do arroz irrigado, sistema pré germinado**. Viçosa: Planta daninha, vol.19, n.º. 3, 2001.

OLIVEIRA, R. A. **Crescimento e desenvolvimento de três variedades de cana-de-açúcar, em cana planta, no Estado do Paraná: Taxas de crescimento**. Sci. Agr.,v. 5, n. 1-2, p. 87-94, 2004.

OLIVEIRA, R. S. **Mecanismos de ação de herbicidas**. cap 7, p.1-36, 2008b. Disponível em: <http://www.dag.uem.br/napd/disciplinas/atualizacao/graduacao/cien_plan_dan/cap_7.pdf.com.br>. Acesso em: 13 de setembro de 2011.

OLIVEIRA, R. S. **Seletividade de herbicidas para culturas e plantas daninhas**. cap. 9, p. 1-16, 2008a. Disponível em: <http://www.dag.uem.br/napd/disciplinas/atualizacao/graduacao/cien_plan_dan/cap_7.pdf.com.br>. Acesso em: 03 de dezembro de 2011.

OLIVEIRA, E.C.A.; OLIVEIRA, R.I.; ANDRADE, B.M.T.; FREIRE, F.J.; LIRA, M.A.; MACHADO, P.R. **Crescimento e acúmulo de matéria seca em variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena**. Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental. vol.14 no.9, Campina Grande, 2010.

OLIVEIRA, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011, 348p.

PITELLI, R.A. **Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.11, n.129, p. 16-27, 1985.

PMGCA. **RB98710: Alto desempenho e produtividade**. Maceió: Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar, 2010. Disponível em: <<http://gazetaweb.globo.com/gazetadealagoas/acervo.php?c=170253>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2011.

PROCÓPIO, S. O. **Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003, 150p.

RAPOSSO, A., OLIVEIRA, J.P., TEIXEIRA, R.B. **Biofábrica para a produção de mudas em larga escala**. Acre: Embrapa, 2012. Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=21939&secao=Artigos%20Especiais>>. Acesso em: 03 de janeiro de 2013.

RIBEIRO, P.R. **Curso sequencial de automação para indústria sucroalcooleira**. Ribeirão Preto: UNAERP, 2006, 113p.

RIDESA. **Catálogo Nacional de Variedades “RB” de Cana-de-Açúcar**. Curitiba: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento Sucroalcooleiro, 2010, 136p.

RIDESA. **Censo Varietal e Clones Potenciais para os Estados de Alagoas e Pernambuco**. Ribeirão Preto: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento Sucroalcooleiro, 2011, 43p.

RIZZARDI, M.A. **Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos**. Ciência Rural, v.33, n.5, p.957-965, 2003.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: UNESP, 1995, 101p.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. Londrina: Edição dos autores, 2005. 591p

RODRIGUES, A.A.; PRIMAVESI, O.; ESTEVES, S.N. **Efeito da qualidade de variedades de cana-de-açúcar sobre seu valor como alimento para bovinos**. Pesq. Agropec. bras., Brasília, v.32, n.12, dezembro, 1997.

ROLIM, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. **Período crítico de competição de plantas daninhas com cana-planta de ano**. Saccharum, São Paulo, v. 5, n. 22, p. 21-26, 1982.

ROSÁRIO, A. **Alagoas comemora rendimento de variedade de cana-de-açúcar**. Alagoas, 2011. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/noticia/al-comemora-rendimento-de-variedade-da-cana-de-acucar_126196.html>. Acesso em: 01 de outubro de 2011.

ROSÁRIO, A. **PMGCA Avalia o desempenho de nova variedade da safra 2010/11**. Alagoas, 2010. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/noticias/pmgca-comeca-a-avaliar-desempenho-de-nova-variedade-na-safra-2010-11_119374.html>. Acesso em: 14 de dezembro de 2011.

SANTOS, J.B.; SILVA, A.A.; COSTA, M.D.; JAKELAITIS, A.; VIVIAN, R.; SANTOS, E.A. **Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici***. Planta Daninha, v.24, p.457-465, 2006.

SEON, J.H.; CUI, Y.Y.; KOZAI, T.; PAEK, K.Y. **Influence of in vitro growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, n. 61, p. 135-142, 2000.

SCHIAVETTO, A.R.; PERECIN, D.; AZANIA, C.A.M.; ZERA, F.S.; AZANIA, A.A.P.M.; LORENZATO, C.M. **Tolerância de cana-de-açúcar a herbicidas avaliada pela diferença dos tratamentos**. Planta daninha, v.30, n.1, Viçosa, 2012.

SILVA, A.A.; SILVA, J.F.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R. **Proteção de Plantas – Manejo de Plantas Daninhas**. Viçosa: ABEAS - Curso de Proteção de Plantas, 2005, 217p.

SINDAG – **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola**. 2008. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em: 10 de setembro de 2011.

SKOOG, F. & MILLER, C.O. **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro**. Symp. Soc. Exp. Biol.11: 118-231, 1957.

SOUZA, J. R. **Tolerância de variedades de cana-de-açúcar a herbicidas aplicados em pós-emergência e efeitos residuais sobre variedades de girassol.** 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SUTTER, E.; LANGHANS, R.W. **Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture.** *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 104:493-6, 1979.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

TEIXEIRA, J.B. **Biorreatores.** Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. vol.4 no.24, Brasília, 2002.

TERRA, M.A. **Seletividade de diclosulam, trifloxysulfuron-sodium e ametryne a variedades de cana-de-açúcar.** 2003. 60 f. Dissertação (mestrado em Agricultura) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2003.

TERUEL, D.A.; BARBIERI, L.A.; FERRARO, Jr. **Sugarcane leaf area index modeling under different soil water conditions.** *Scientia Agraria*, v.54, n.especial, p.39-44, 1997.

TIMOSSI, P.C.; ALVES, P.L.C. A. **Efeitos da deriva de clomazone, aplicado isoladamente ou em mistura com ametryn, sobre características produtivas de laranjeira Hamlin.** Viçosa: Planta daninha, vol.19, n.º. 2, 2001.

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. *In: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.* Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 261-269, 1998, 509p.

TUFFI SANTOS, L.D. **Glyphosate sobre a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto.** *Planta Daninha*, v.25, n.1, p.139-147, 2007.

UFV. **Caracterização morfológica e agrônômica da variedade RB966928.** UFV, 2011. Disponível em: <<http://canaufv.com.br/backup/variedadesRB/RB966928%20.pdf>>. Acesso em 04 de dezembro de 2011.

USP. **Importância da cana-de-açúcar.** Disponível em: <http://www.mecatronica.eesc.usp.br/wiki/index.php/Import%C3%A2ncia_da_cana-de-a%C3%A7%C3%BAcar>. Acesso em: 02 de dezembro de 2011.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 22p.

VELINI, E.D.; FREDERICO, L.A.; MORELLI, J.L.; KOJIMA, K. **Avaliação dos efeitos do herbicida clomazone, aplicado em pós-emergência, sobre o crescimento e produtividade de soqueiras de nove variedades de cana-de-açúcar.** Águas de São Pedro: STAB, 1993, p.125-128.

VELINI, E. D. **Avaliação da seletividade da mistura de oxyfluorfen e ametryne, aplicada em pré e pós-emergência, a dez variedades de cana-de-açúcar (cana planta).** *Planta Daninha*, v. 18, n. 2, p. 123-134, 2000.

VICTÓRIA FILHO, R.; CHRISTOFFOLETI, P. J. **Manejo de plantas daninhas e produtividade da cana.** Visão Agrícola, USP ESALQ, Piracicaba, n.1 p. 32-37, 2004.

VIEIRA, R. A.; SILVA, C. M.; SOUTO, E. R.; HATA, F. T.; MACHADO, M. F. P. S.; MARCUZ, F. S. **Diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina e cinetina na micropropagação in vitro de variedades RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar.** Campo Digital, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p.122-126, 2009.

WEED SCIENCE. **Registers of resistant weeds.** Disponível em: <http://www.weedscience.org/Summary/UspeciesMOA.asp>. Acesso em: 21 de janeiro de 2013.

WIXSON, M. B. **Use of AC 263,222 for sicklepod (Cassia obtusifolia) control in soybean (Glycine max).** Weed Technol., v. 5, p. 276-279, 1991.

ZAVATTIERI, A. **Biotecnologia Vegetal.** Portugal: Universidade de Évora. 2002, 32p.

ZIMDHAL, R.L. **Fundamentals of weed science.** San Diego, CA: Academic Press, Inc. 1993. 450p.