

COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E FISIOLÓGICO
PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp. var.
NA56-79) REGENERADAS "IN VITRO" E EM
PRESENÇA DE HERBICIDAS

ISAAC STRINGUETA MACHADO

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro / 1984

"..., e tenham toda riqueza da forte convicção do entendimento, para compreenderem plenamente o mistério de Deus, CRISTO, em quem todos os tesouros da sabedoria e do conhecimento estão ocultos".

Colossenses 2: 2b-3

OFEREÇO

a memória de Manoel de Andrade Machado, meu pai
e à Dormina Stringueta Machado, minha mãe

DEDICO

à Lukirca Rakela, minha avó,
com carinho e admiração por
tudo o que fez e é.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, meu orientador, entusiasta e talentoso cientista de vanguarda.

Profa. Dra. Sheila Zambello de Pinho, primeira orientadora e sempre amiga. Agora me auxiliando na análise estatística dos dados experimentais.

Prof. Dr. Heitor Segundo Medina, Prof. Dr. Igor Vassilieff e Profa. Dra. Vera Silvia Vassilieff, que me encorajaram na iniciação de pesquisa científica.

Enio Tiago de Oliveira, Carlos Dorelli e Sergio Dorelli, auxiliaadores na parte experimental.

Maria Aparecida Schiavuzzo, Roberto Bonetti, Izabel E. Eimori e Celi Daghlian, pela amizade que me fortaleceu no decorrer de todo o trabalho.

Neftali Ochoa-Alejo, Cristina H.R.P. Gonçalves, Irene M. Santos Vieira e demais colegas de laboratório, por estimularem e enriquecerem com sugestões valiosas esta pesquisa.

Eng^o Agr^o Angelo Cataneo, pelo processamento dos dados experimentais. Ana Cristina Pardini de Melo, pelo auxílio na versão para a língua inglesa. Adalberto Francisco dos Santos

tos, pelo trabalho de desenho. Joel Campos dos Santos e Jocelei Stringueta Machado, pela datilografia.

Os benefícios de quatro Instituições tornaram possível o meu trabalho:

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA (CENA), pelo uso dos laboratórios e casa-de-vegetação.

FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS (FINEP), pela compra de drogas e equipamento de trabalho.

PLANO NACIONAL DO AÇÚCAR E DO ALCOOL (PLANALSUCAR), pela cessão dos toletes de cana-de-açúcar.

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (CNPq), pela bolsa concedida.

Í N D I C E

Página

RESUMO	xv
SUMMARY	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Regeneração da planta em meio indutor da dife renciação celular e em presença de herbicidas	21
3.1.1. Obtenção dos explantes e indução de for mação de calos na cultura de tecidos ..	21
3.1.2. Regeneração da planta inteira a partir de calos tratados com herbicidas	23
3.1.3. Avaliação dos resultados	24
3.2. Efeito do ácido 2,2-dicloropropiônico (dala pon) sobre o comportamento fisiológico, teor de carboidratos e proteínas em plantas cultiva das em solução nutritiva, após terem sido rege neradas na cultura <i>in vitro</i>	24
3.2.1. Avaliação do comportamento fisiológico das plantas	26
3.2.2. Análises	27
3.2.2.1. Proteína	27

3.2.2.1.1. Quantificação do <u>ni</u> trogênio total	27
3.2.2.2. Açúcares solúveis em álcool ...	28
3.2.2.2.1. Extração	28
3.2.2.2.2. Quantificação dos a çúcares solúveis to tais	29
3.2.2.2.3. Quantificação dos a çúcares redutores...	30
3.2.3. Análise estatística dos resultados	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Regeneração da planta em meio indutor da dife <u>re</u> renciação celular e em presença de herbicidas.	33
4.2. Efeito do ácido 2,2-dicloropropiônico (dalapon) sobre o comportamento fisiológico, teor de car <u>bo</u> idratos e proteínas em plantas cultivadas em solução nutritiva, após terem sido regeneradas na cultura <i>in vitro</i>	43
4.2.1. Efeito sobre o crescimento e morfologia das plantas	43
4.2.2. Influência no teor de proteína	58
4.2.3. Efeito sobre o teor de açúcares solúveis totais e redutores	61
5. CONCLUSÕES	66

6. LITERATURA CITADA	70
7. APÉNDICE	82

LISTA DAS TABELAS

Tabelas		Página
1	Frequência das notas referentes à morfogênese da planta de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp. var.NA56-79) em meio indutor da diferenciação celular e em presença de diferentes concentrações de ametrin	34
2	Frequência das notas referentes à morfogênese da planta de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp. var.NA56-79) em meio indutor da diferenciação celular e em presença de diferentes concentrações de dalapon	35
3	Médias de comprimento (cm) da parte aérea (colmo+folhas) de cana-de-açúcar, influenciado pela exposição da planta a diferentes concentrações (ppm) de dalapon em diferentes períodos (horas) de tratamento	83
4	Médias de comprimento (cm) da raiz de cana-de-açúcar, influenciado pela exposição da planta a diferentes concentrações (ppm) de dalapon em diferentes períodos (horas) de tratamento	84
5	Médias da produção de MATÉRIA FRESCA (grama/planta) da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos	85
6	Médias da produção de MATÉRIA FRESCA (grama/	

Tabelas

Página

	planta) da raiz de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos	86
7	Médias da produção de MATÉRIA SECA (grama/planta) da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos	87
8	Médias da produção de MATÉRIA SECA (grama/planta) da raiz de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos	88
9	Média dos teores de PROTEÍNAS (mg/100 mg m.s.) na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos	89
10	Média dos teores de PROTEÍNAS (mg/100 mg m.s.) na raiz de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos	90
11	Conteúdo médio de AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS(mg/100 mg m.s.) da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos	91
12	Conteúdo médio de AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS(mg/100 mg m.s.) da raiz de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos	92
13	Média dos teores de AÇÚCARES REDUTORES (mg/100 mg m.s.) na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos.....	93
14	Média dos teores de AÇÚCARES REDUTORES (mg/100 mg m.s.) na raiz de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos	94

LISTA DAS FIGURAS

Figuras	Página
1 e 2 Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 40, 80 e 160 ppm) de dalapon na regeneração <i>in vitro</i> da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.var. NA56-79)	37
3 e 4 Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 40, 80 e 160 ppm) de ametrin na regeneração <i>in vitro</i> da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.var. NA56-79)	38
5 Influência do dalapon (grupo controle e 20 ppm) sobre a regeneração da planta inteira (parte aérea+raiz) de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.var.NA56-79) na cultura de tecidos	39
6 e 7 Influência do ametrin (grupo controle, 20 e 40 ppm) sobre a regeneração da planta inteira (parte aérea+raiz) de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.var.NA56-79) na cultura de tecidos	40
8 Valores médios do comprimento da parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos cultivadas em solução nutritiva e não tratadas com dalapon (grupo controle)	44
9 Valores médios do comprimento da parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos, cultivadas em solução nutritiva e tratadas com dalapon por um TEMPO DE EXPOSIÇÃO ao herbicida de 2 horas.	45

Figuras

Página

10	Valores médios do comprimento da parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos, cultivadas em solução nutritiva e tratadas com dalapon por um TEMPO DE EXPOSIÇÃO ao herbicida de 8 horas.....	46
11	Valores médios do comprimento da parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos, cultivadas em solução nutritiva e tratadas com dalapon por um TEMPO DE EXPOSIÇÃO ao herbicida de 32 horas	47
12	Valores médios do comprimento da parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos, cultivadas em solução nutritiva e tratadas com dalapon por um TEMPO DE EXPOSIÇÃO ao herbicida de 128 horas	48
13	Valores médios do comprimento da parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos, cultivadas em solução nutritiva e tratadas com dalapon por um TEMPO DE EXPOSIÇÃO ao herbicida de 512 horas.....	49
14	Efeito das diferentes concentrações de dalapon sobre a produção de MATÉRIA FRESCA na parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos e	

Figuras

Página

	cultivadas em solução nutritiva	50
15	Efeito das diferentes concentrações de dalapon sobre a produção de MATÉRIA SECA na parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva	53
16e17	Plantas de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp. var. NA56-79) regeneradas na cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon, na presença de diferentes concentrações de dalapon (0, 25, 50 e 75 ppm) nos tempos de 0 (grupo controle) e 2 horas de exposição das raízes ao herbicida.....	54
18e19	Plantas de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp. var. NA56-79) regeneradas na cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon, na presença de diferentes concentrações de dalapon (0, 25, 50 e 75 ppm) nos tempos de 8 e 32 horas de exposição das raízes ao herbicida.....	55
20e21	Plantas de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp. var. NA56-79) regeneradas na cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon, na presença de diferentes concentrações de dalapon (0, 25, 50 e 75 ppm) nos tempos de 128 e 512 horas de exposição das raízes ao herbicida	56

Figuras

Página

22	Conteúdo de PROTEÍNAS na parte aérea (Colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas na cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de dalapon	59
23	Efeito das diferentes concentrações de dalapon sobre o conteúdo de AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS na parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva	62
24	Influência das diferentes concentrações de dalapon sobre o teor de AÇÚCARES REDUTORES na parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva	64

ABREVIações USADAS

No presente trabalho foram usadas abreviaturas, principalmente as relacionadas a seguir:

RNA	=	Ácido ribonucleico
2,4-D	=	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
2,4-DB	=	Ácido 2,4-Diclorofenoxibutírico
NAA	=	Ácido naftaleno acético
m.s.	=	matéria seca
cv.	=	cultivar
var.	=	variedade

COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO E FISIOLÓGICO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp. var. NA56-79) REGENERADAS *IN VITRO* E EM PRESENÇA DE HERBICIDAS.

ISAAC STRINGUETA MACHADO

ORIENTADOR: PROF. DR. OTTO JESU CROCDMO

RESUMO

Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp var. NA56-79) tolerantes ao ametrin (4-etilamino-6-isopropilamino-2-metiltio-1,3,5,-triazina) e dalapon (ácido 2,2-dicloropropiônico) foram regeneradas através da cultura de tecidos, em presença de diferentes concentrações dos herbicidas (0, 20, 40, 80 e 160 ppm) nos meios de cultura indutores da parte aérea e raiz. O experimento foi conduzido na Seção de Bioquímica de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, por um período de 10 semanas; os frascos de cultura foram incubados a uma temperatura de 24°C e iluminação fluorescente-incandescente. A frequência de regeneração das plantas foi feita através de avaliações visuais semanais.

A maior regeneração de plantas de cana-de-açúcar tolerantes foi observada no tratamento com o herbicida tri

azínico ametrin, mesmo na concentração de 40 ppm, onde foram ob-
tidas plantas inteiras. O dalapon mostrou ser o mais fitotóxico
inibindo, na concentração de 20 ppm, a regeneração da parte ae-
rea.

Foi realizado ainda, um estudo do comportamento
anatômico-fisiológico de plantas de cana-de-açúcar da mesma va-
riedade, regeneradas em cultura de tecidos e cultivadas em so-
lução nutritiva completa de Hoagland e Arnon em diferentes com-
binações: tempo de exposição (0, 2, 8, 32, 128 e 512 horas)-
concentração de dalapon (0, 25, 50 e 75 ppm). As plantas regene-
radas foram testadas em casa de vegetação, por um período de 6
semanas e avaliadas através de medidas semanais de crescimento,
produção final de matéria fresca e seca e quantificação das pro-
teínas e açúcares solúveis totais e redutores.

O dalapon apresentou progressiva inibição do
crescimento das plantas em combinações crescentes superiores
a 32 horas de exposição - 25 ppm do herbicida. Efeitos terato-
gênicos na formação das plantas foram também observados. Combi-
nações superiores a 32 horas de exposição - 50 ppm de dalapon
promoveram aumento na estimativa do teor de proteínas, pela
elevação dos níveis de nitrogênio total na planta. A presen-
ça de dalapon na solução nutritiva não alterou ou provocou a
diminuição do teor de açúcares solúveis totais e redutores das
plantas testadas.

Os resultados diferem parcialmente daqueles obtidos em outros estudos da ação fitotóxica dos mesmos herbicidas em cultura de células de cana-de-açúcar não diferenciadas ou naquelas plantas propagadas e cultivadas de maneira convencional. Isso evidencia a ocorrência de variação somaclonal nas plantas regeneradas na cultura de tecidos. A técnica de regeneração de plantas prestou-se, portanto, à indução de variabilidade genética, ou à manifestação de variabilidade genética natural já existente na população original.

BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL BEHAVIOUR OF SUGARCANE PLANTS
(*Saccharum* spp. var. NA56-79) REGENERATED *IN VITRO* AND IN
PRESENCE OF HERBICIDES

ISAAC STRINGUETA MACHADO

ORIENTADOR: PROF. DR. OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY

Tolerant sugarcane plants (*Saccharum* spp var. NA56-79) to ametryn (4-ethylamino-6-isopropylamino-2-methyltio-1,3,5,-triazine) and to dalapon (2,2-dichloropropionic acid) were regenerated through tissue culture, with different herbicidal concentrations (0, 20, 40, 80, 160 ppm) in induction culture medium of shoot and root. The research was led at the Plant Biochemistry Sector, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA, USP, Piracicaba-SP) for a period of 10 weeks; the culture flasks were incubated at 24⁰C under fluorescent-incandescent light. The frequency of plant regeneration was evaluated through weekly scores.

At 40 ppm ametryn a great number of plants was regenerated. On the other hand, dalapon at 20 ppm inhibited plant regeneration.

Morphological - physiological observation were made in the callus-regenerated plants which were grown in Hoagland and Arnon's complete mineral nutrient solution in different combinations: exposure time (0, 2, 8, 32, 128, 512 hours)-dalapon concentration (0, 25, 50, 75 ppm). The regenerated plants were maintained in the greenhouse, for a period of 6 weeks and their growth was measured weekly. Final production of fresh and dry matter was made as well as the quantification of proteins and total soluble and reducer sugars.

Progressive inhibition of plant growth was observed as dalapon concentration increased in the nutrient solution mainly in combinations above 32 hours of exposure - 25ppm of herbicide. Teratogenic effects in the plant formation were also observed. Combinations above 32 hours of exposure - 50ppm of dalapon caused an increase in the estimative of protein content, by rising the total nitrogen levels in the plant. The presence of the herbicide in the nutrient solution did not change total soluble sugar and reducing sugar content of the plants.

The results were different from those obtained in other studies of phytotoxic action, using the same herbicides in cultures of non-differentiated sugarcane cells or on those plants cultured in the conventional way. This demonstrates that possibly somaclonal variation has occurred. The *in*

vitro plant regeneration technique has served, therefore, to induce genetic variability, or to show natural genetic variability already existing in the original population.

1. INTRODUÇÃO

Os vários tipos de herbicidas empregados atualmente no controle químico de plantas daninhas na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), podem provocar significantes alterações nos processos fisiológicos da própria planta cultivada *in vitro*. É portanto, de grande utilidade a obtenção de variantes clonais de plantas resistentes aos herbicidas, especialmente das plantas cultivadas comercialmente. Isto certamente deve facilitar os estudos do modo de ação desses compostos químicos no organismo vegetal.

Deve-se reconhecer que, exceto para os efeitos empíricos sobre o crescimento e rendimento de açúcar, pouquíssima informação acompanha o produto comercial em relação a seu modo de ação, suas limitações ou seu potencial na promoção de crescimento, na regulação da produção de açúcar ou, ainda, sobre os tipos de variações que pode induzir na planta (ALEXANDER, 1973). Partindo-se deste ponto de vista aprecia-se a necessidade de novas ferramentas com as quais possa ser examinado ou avaliado rapidamente o potencial bioquímico de um produto comercial. É por esta razão que alguns pesquisadores adotaram a cultura de células ou tecidos para explorar os efeitos de produtos químicos (NICKELL, 1967 a, b; NICKELL e MARETZKI, 1970; ZILKAH e GRESSEL, 1977 a, b; ZILKAH *et alii*, 1977; OSWALD *et alii*, 1978; SMITH, 1979; CROCOMO *et alii*, 1979; 1981 a, b, 1982 e CROCOMO e OCHOA-ALEJO, 1983).

Apesar da cultura de células vegetais ter sido desenvolvida há muitos anos atrás, ela não tem sido amplamente usada em estudos metabólicos sobre toxicidade. Além disso, os resultados de fitotoxicidade em cultura de células ou tecidos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) até hoje publicados não tem sido comparados simultaneamente com o efeito em plantas intactas.

O principal acontecimento registrado na cultura de células e tecidos vegetais foi a regeneração de plantas

a partir de calo e célula isolada. A regeneração é um claro reforço para o conceito da totipotência, a capacidade informacional inerente das células em produzir um organismo inteiro de comportamento anatômico-fisiológico idêntico ao original. Assim, teoricamente, uma pequena porção de calo, aglomerado de células não diferenciadas, pode possuir um milhão de células totipotentes, representando um milhão de plantas em cultura de tecidos, com um tempo de geração de poucos dias. A regeneração da planta *in vitro* não é somente a base de muito da nossa tecnologia celular atual, mas também significa um acontecimento histórico na biologia básica (GRESSEL, 1980). Os fatos da célula possuir todas as suas organelas desenvolvidas, fazendo tudo o que a planta inteira faz, e ainda a rapidez de obtenção da planta regenerada, tornam essa técnica bastante interessante e importante nos programas de obtenção de linhagens de plantas tolerantes a herbicidas.

Dos estudos dos efeitos de herbicidas sobre a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), possivelmente um dos achados mais importantes foi a consistente indução da diferenciação celular e em alguns casos promoção do crescimento da planta pelo dalapon (ácido 2,2-dicloropropiônico)(FAWCETT *et alii*, 1956; NICKELL, 1967 a, b e BARBA e NICKELL, 1969), herbicida há muito anos usado no controle de plantas daninhas. A natureza de seu modo de ação, contudo, ainda permanece obscura.

Assim, devemos considerar a grande importância de novos métodos de avaliação do potencial bioquímico dos produtos químicos comerciais; a necessidade de obtenção de clones de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) tolerantes a herbicidas e suas conseqüentes vantagens; a cultura de tecidos como técnica de comprovada utilidade nos modernos programas de melhoramento vegetal e a escassez de experimentação científica na área.

Diante do exposto, nos propusemos a realizar o presente trabalho. O seu objetivo primário foi o de comparar alguns dos efeitos do ametrin (4 - etilamino - 6 - isopropilamino - 2 - metiltio - 1, 3, 5 - triazina) e dalapon (ácido 2,2 dicloropropiônico), herbicidas frequentemente usados no combate às plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). Do segundo herbicida, pretendeu-se ainda, uma observação do seu efeito sobre plantas obtidas por regeneração a partir de células cultivadas *in vitro*. Um novo aspecto de avaliação do modo de ação deste herbicida, pois os resultados até o momento obtidos por outros pesquisadores, referem-se à sua ação sobre cultura de células não diferenciadas (cálos) ou planta inteira propagada de maneira convencional. Estes estudos proporcionariam ainda a complementação e confirmação de protocolo para regeneração de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) tolerantes a herbicida, da Seção de Bioquímica de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), onde os mesmos seriam realizados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Com a introdução dos herbicidas no comércio, há trinta anos atrás, Abel (1954) e Harper (1956) citados por GRESSEL (1978), fizeram predições de que o uso repetitivo desses produtos, deveria acarretar uma seleção de plantas resistentes. Isto seria semelhante ao que vinha ocorrendo com outros grupos de pesticidas, simultâneamente lançados: das drogas antibióticas aos raticidas. Sugeriu-se por isso, que herbicidas e culturas fossem alternados, evitando-se assim, o seu uso contínuo. Contudo, sabe-se hoje da existência de muitos agricultores que não obstante a recomendação original, u-

utilizaram-se do mesmo herbicida continuamente, na mesma cultura e na mesma área. Nesses casos não se observou seleção aparente de mutantes resistentes das espécies de plantas daninhas, que se reproduziam sucessivamente. Um bom exemplo é o 2,4-D, herbicida seletivo largamente usado no controle de plantas daninhas dicotiledôneas, com frequência anual de aplicação, sem rotação de cultura e em muitos lugares por mais de 25 anos. Contudo, nenhum caso de resistência genética a este herbicida foi até agora observado.

GRESSEL (1978) registrou uma bem substanciada exceção, concernente aos herbicidas triazínicos. Esses produtos são mais persistentes no solo que os demais herbicidas, permanecendo ativos por meses e até anos, dependendo do solo e clima (FRANK *et alii*, 1983). Segundo FRYER e MAKEPEACE (1972) esses herbicidas no cultivo do milho (*Zea mays*) e em viveiros comerciais de mudas, são frequentemente aplicados, duas vezes ao ano. Desta forma devem exercer maior pressão de seleção que os herbicidas foliares de contato e aqueles que são rapidamente degradados.

Apesar do uso contínuo de herbicidas, somente poucos casos de resistência genética têm sido registrados. GRESSEL e SEGEL (1978) sugerem que isto seja devido a combinação da baixa pressão de seleção da maioria dos herbicidas; a menor capacidade das linhagens de plantas daninhas em competir e reproduzir na ausência do herbicida; a habilidade das

plantas daninhas susceptíveis produzirem maior quantidade de sementes que as resistentes, após a aplicação do herbicida; e ainda, o solo funcionando como um grande reservatório de sementes de plantas daninhas susceptíveis. Nos poucos casos registrados de resistência genética a herbicidas, uma alta pressão de seleção mostrou ser de grande importância. Contudo, as condições para se obter alta pressão de seleção no campo são difíceis, senão impossíveis de serem estabelecidas e mantidas por um longo período de tempo.

Quando a totipotência das células foi demonstrada, como a capacidade de uma célula em regenerar uma planta inteira, abriram-se novas perspectivas no campo da genética de plantas. Os recentes avanços no isolamento e cultura de células, tecidos e protoplastos, permitem uma rápida seleção de mutantes naturais, que existem em uma certa população de células, ou então, o aumento na frequência de mutação através do uso de mutagênicos. Essa nova tecnologia permite a manipulação de grandes populações de células, em espaços pequenos e pouco tempo de duração (CROCOMO e OCHOA-ALEJO, 1983).

GRESSEL (1980) ao avaliar o uso da cultura de células na pesquisa com pesticidas, mostrou ser de grande importância a obtenção de linhagens de plantas resistentes aos herbicidas, principalmente aquelas de interesse econômico. O uso da cultura de tecidos nesses programas de seleção é muito mais vantajoso que os programas tradicionais; isso é devido

o fato de se ter com esta técnica, o mesmo número de unidades totipotentes por unidade de área, acarretando redução de custo e trabalho.

A cultura de células, tecidos, protoplastos e órgãos como uma nova tecnologia, capaz de manifestar a totipotência das células somáticas, foi originada das especulações científicas do Professor Haberlandt na Alemanha do começo do século. Três décadas depois aconteceram os primeiros sucessos de White, que manteve ápices de raízes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) *in vitro*, por um tempo indeterminado. Muitas outras contribuições foram feitas, mas o maior impulso aconteceu no período de 1955 a 1965, com a demonstração da totipotência das células de plantas superiores. CESTARI (1975) define a cultura de tecidos como o cultivo de células, tecidos e fragmentos de órgãos fora do organismo, em meios naturais ou artificiais, e geralmente, em recipientes esterilizados de vidro. É a maneira de se conservarem os tecidos vivos em laboratório, por um tempo limitado ou indefinidamente, para fins de investigação biológica. Inicialmente, foi um método voltado para o crescimento do tecido *in vitro*, que permitia o estudo do comportamento das características e das necessidades das células em cultura, na ausência de interferências do organismo. Atualmente é um método que fornece à Biologia um vasto campo experimental.

A totipotência das células relacionada com as

plantas de propagação vegetativa, implica em que todas as células diferenciadas, com exceção daquelas que são programadas exclusivamente para cumprir um padrão restrito de especialização, possuem uma grande capacidade em manifestar todo o seu potencial genético e desenvolvê-lo através de padrões semelhantes aos de um zigoto, conduzindo assim a formação de uma nova planta. Este conceito vem esclarecer que células em irreversíveis processos de diferenciação, como as traquéias e tubos vasculares, podem não expressar totipotência. Assim, totipotência de uma célula de planta é sua diferenciação em uma planta completa, através de estágios semelhantes ao de um embrião (RAGHAVAN, 1977).

EVANS *et alii* (1981) confirmam ser o aumento nas colheitas, o principal objetivo da pesquisa em cultura de tecidos de planta. Observam que antes das técnicas genéticas celulares poderem ser aplicadas no melhoramento vegetal, precisamos obter protocolos de laboratório mais claros e completos para a regeneração de planta *in vitro*. Justificam esta observação através da citação de diversos trabalhos sobre regeneração e propagação de plantas *in vitro*, publicados nos últimos anos. É impossível a obtenção direta de informação necessária, para reproduzir tais experimentos. Os artigos não trazem nenhuma informação acerca da obtenção do explante, meio de cultura ou concentração de hormônios.

A regeneração de plantas pode ser utilizada pa

ra a obtenção de mutantes genéticos, induzidos *in vitro*. Por exemplo, mutagênese, fusão de protoplasto ou DNA recombinante, após serem usados para modificar geneticamente a célula da planta, requerem propagação do material, para assim, serem descobertas as alterações induzidas. Por outro lado, existem evidências de que o simples uso da técnica de regeneração de planta, pode originar populações de indivíduos, que contenham uma grande variabilidade genética, ou seja ocorre variação somaclonal. Assim, a cultura de tecido pode ser usada para induzir variabilidade genética, ou para manifestar a variabilidade genética natural já existente.

LIU *et alii* (1972) observaram variação morfológica no perfilhamento e estruturação de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), regeneradas de cultura de tecidos. As mudanças morfológicas ou citogenéticas, ocorrendo em plantas diferenciadas, são uma grande confirmação da variabilidade genética originada através do cultivo de calos. O uso da técnica da cultura de tecidos, oferece ainda, um meio excelente de obtenção de plantas propagadas assexuadamente.

Obviamente, o ponto chave para o desenvolvimento de uma nova variedade, está baseado no fenômeno da diferenciação, ou seja, na habilidade de regenerar plantas a partir de células que foram modificadas geneticamente, pela cultura de tecidos (HEINZ *et alii*, 1977 e CROCOMO *et alii*, 1982). As plantas regeneradas são cromossomicamente e morfologicamente

diferentes da planta doadora; o que equivale dizer, que essa capacidade de se obter variabilidade genética, constitui a base teórica para a seleção de mutantes desejáveis para uso agrônomico (LIU, 1981).

A regeneração de planta *in vitro* tem sido induzida principalmente nas espécies de numerosas famílias de plantas dicotiledôneas, mas em geral, monocotiledôneas tem apresentado maior dificuldade de cultivo. Infelizmente, pois as espécies de gramíneas cultivadas comercialmente, são fontes de nutrição extremamente importantes. Isto vem limitar o trabalho de muitos pesquisadores, que tem procurado estudar a regeneração de plantas nessas espécies. Nesse contexto, entretanto, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) constitui uma exceção, pois não tem apresentado dificuldades na regeneração de planta *in vitro* e é também uma das principais culturas econômicas das regiões tropicais e subtropicais. Os pesquisadores não tem poupado esforços, no sentido de aumentar os rendimentos, através da obtenção de melhores variedades, resistentes às doenças ou aos pesticidas (EVANS *et alii*, 1981).

Das variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) empregadas no Brasil e em especial na região centro-sul, a variedade NA56-79 é uma das mais importantes, pela extensão do cultivo e pelas qualidades inerentes: medianamente exigente em água e fertilidade; tombamento regular; despalha fácil; produtividade agrícola razoável no primeiro corte, mas possui

dora de boa capacidade de brotação nas socas, mesmo em condições adversas; e rápido desenvolvimento, fato que a torna indicada também para cana de ano em algumas regiões, sob certas condições favoráveis. Apresenta alta relação caldo/cana, sendo porém, o poder de germinação relativamente baixo e o perfilhamento reduzido, o que deve ser compensado pela utilização de maior quantidade de mudas por ocasião do plantio. Doenças como Carvão, Escaldadura e Mosaico não são limitantes, mas exigem cuidados especiais (BASSINELLO *et alii*, 1976).

O ciclo do melhoramento genético em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) leva geralmente de 12 a 14 anos e, com longo tempo envolvido antes que uma nova variedade seja comercialmente liberada, a indústria do açúcar pode enfrentar declínio de produção, devido a degeneração das variedades. Em adição a isto, o principal problema está em testar o potencial da planta melhorada, por falta de material suficiente a ser plantado. As provas de campo geralmente requerem de 30.000 a 40.000 clones para plantar 1 hectare. Com o auxílio da cultura de tecidos, esses problemas podem ser solucionados visto que, ao final de cerca de 10 meses, é possível obter material suficiente para plantar 1 hectare através dessa técnica (BARBA *et alii*, 1977).

Os sistemas de cultura de células de planta tem um uso potencial no estudo de compostos fitotóxicos, pois eles oferecem um sistema axênico, com quase todas as células

metabolicamente ativas. Além disso, essa técnica pode ser usada como um microteste rápido, para determinar fitotoxicidade. As células ou tecidos mantidos *in vitro*, tem como vantagem a de não apresentar cutícula, e portanto, não precisam muito do transporte intercelular. No entanto, segundo GRESSEL *et alii* (1978), os efeitos em células cultivadas podem não espelhar a sensibilidade das plantas intactas. Embora as células sejam totipotentes, são bem menos diferenciadas que a planta, e nem todos os sistemas bioquímicos estão operando. Pode ser problemático o caso de obtenção de resistência a um herbicida, que apresenta seletividade baseada em espessura ou composição da cutícula da planta. Por outro lado, um herbicida que atue somente por interação com o sistema fotossintético, como o caso dos herbicidas triazínicos, não deveria matar células aclorofiladas. No entanto, OCHOA-ALEJO *et alii* (1981) e CROCOMO *et alii* (1981 a) e demais autores citados pelos mesmos, demonstraram o efeito deletério do herbicida triazínico na cultura de células que não estão fotossintetizando. Assim, se as células em cultura reagem semelhantemente a uma planta, e de se esperar a sua representatividade na planta inteira.

A seletividade ao herbicida ocorre a diferentes níveis, porém principalmente a nível morfológico: tempo de tratamento em relação à germinação da cultura em questão, penetração seletiva, migração, etc. Desta forma, a cultura

de células ou tecidos pode ser menos seletiva para os herbicidas do que para as plantas inteiras. Outros problemas levantados por GRESSEL *et alii* (1978) referem-se a considerações sobre a dependência do efeito do herbicida, em relação ao tamanho e idade da planta, à fase de crescimento do calo, e mesmo à composição do meio onde ele é mantido. O tamanho da planta pode afetar a efetividade de um herbicida. De modo semelhante, quando calos de diferentes tamanhos são transferidos para meio contendo herbicida, eles apresentam diferentes susceptibilidades à inibição do crescimento (ZILKAH e GRESSEL, 1977 a). Células na fase exponencial do crescimento e aquelas na fase estacionária são afetadas de maneira diferente pelo herbicida (GRESSEL *et alii*, 1978). A composição hormonal do meio também influencia a sensibilidade ao herbicida. Um nível maior de 2,4-D foi necessário para inibir o crescimento de calos de *Solanum* spp, mantidos em um meio contendo NAA-cinetina, quando comparado com calos em meio com baixo nível de hormônio (ZILKAH e GRESSEL, 1977 a).

Estudo sobre o efeito comparativo de herbicidas, em células cultivadas *in vitro* e em plântulas, foi desenvolvido por ZILKAH e GRESSEL (1977 a, b) e ZILKAH *et alii* (1977). Os efeitos de 22 herbicidas foram testados sobre plântulas, calos e células de 4 espécies de plantas (*Solanum*, *Lycopersicum*, *Cirsium* e *Chrysanthemum*). Nesse caso, houve uma correlação positiva entre os efeitos fitotóxicos, provoca

dos pela maior parte dos herbicidas, no material cultivado em meio sintético.

SWANSDON e TOMES (1980) obtiveram resistência ao 2,4-D isolando linhagens de calos de *Lotus corniculatus* cv. Leo. Duas linhagens de calos selecionadas: uma mostrando rápido crescimento e outra com menor crescimento, na presença de 1 mg. l^{-1} de 2,4-D.

CROCOMO *et alii* (1981 a) avaliaram os efeitos de dois herbicidas e um amadurecedor químico, no crescimento de calos, derivados de explantes do internódio foliar de três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). Foram observadas respostas diferentes aos herbicidas: ametrin (triazina) e dalapon (ácido alifático) e ao amadurecedor mefluidide, usados em concentrações de 0, 20, 40, 80 e 160 ppm. Os calos da variedade CB41-76 apresentaram maior sensibilidade aos três compostos, que aqueles das variedades IAC48-65 e NA56-79, que mostraram um mesmo grau de tolerância. Dos três compostos, ametrin foi o que mostrou maiores efeitos deletérios nas três variedades estudadas.

Outros trabalhos sobre fitotoxicidade em culturas de células foram desenvolvidos por DAVIS *et alii* (1972), DIAZ-COLON *et alii* (1972) e BOYEY *et alii* (1974). Estudos sobre o mecanismo de ação dos herbicidas em células isoladas, também tem sido relatados (ASHTON *et alii*, 1977 e aqueles ci-

tados por GRESSEL, 1980).

Chaleff e Persons (1978), citados por GRESSEL (1980), foram os primeiros a registrar a obtenção de plantas resistentes a herbicidas, e regeneradas na cultura de tecidos. Nesse trabalho os autores regeneraram plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) resistentes ao picloram. É de especial interesse, pois a seleção aconteceu sem o uso de mutagênicos ou haploidização. Radin e Carlson (1978), também citados por GRESSEL (1980), foram pioneiros na seleção de plantas resistentes a herbicidas, de ação direta na fotossíntese. Selecionaram para resistência a bentazon e phenmediphan, usando a mesma planta, e a mesma técnica de cultura de tecidos.

O ametrin (4 - etilamino - 6 - isopropilamino - 2 - metiltio - 1, 3, 5 - triazina) é um herbicida que pertence ao grupo das triazinas. Os herbicidas triazínicos tem mostrado efeitos inibitórios sobre todos os órgãos de plantas intactas. Isso tem sido atribuído à inibição da fotossíntese como sítio comum de ação (ASHTON e CRAFTS, 1973). O sítio de ação dos herbicidas triazínicos é ao nível do fotossistema II. Em células isoladas de folhas, a atrazina - herbicida triazínico - inibe a fotossíntese, e a síntese de proteína, RNA e lipídios (ASHTON *et alii*, 1977). Por outro lado, o estímulo do crescimento vegetal por triazinas, também tem sido observado (ESSER *et alii*, 1975). NADAR *et alii* (1975) observaram ainda uma promoção no crescimento de cultura de calos de sor

go (*Sorghum bicolor* L. Moench), pelo uso de doses não letais de herbicidas triazínicos. Entretanto, o estímulo ou inibição do crescimento, depende da concentração do herbicida e do tipo de planta (DE VRIES, 1963; GOREN e MONSELISE, 1965 e FRENEY, 1965). A inibição do crescimento de células de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) aclorofiladas, sugere a existência de outros sítios de ação do ametrin, como tem sido proposto para

os herbicidas triazínicos (JORDAN *et alii*, 1966; EBERT e VAN ASSCHE, 1969; ASHTON e URIBE, 1962; ASHTON *et alii*, 1977 ; CROCOMO *et alii*, 1981 a e OCHOA-ALEJO, 1983).

O ácido 2,2-dicloropropiônico, comumente conhecido por dalapon, é um composto alifático clorado, usado amplamente como herbicida. Este composto químico foi dado a conhecer em 1951, pela Dow Chemical Company dos Estados Unidos, e desde então vem sendo testado extensivamente em todo o mundo. Os sintomas fitotóxicos deste herbicida são caracterizados pela inibição do crescimento, clorose foliar e más formações, especialmente na região apical da parte aérea (ASHTON e CRAFTS, 1973).

Em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) tem sido constatado que o dalapon produz injúria durante o brotamento normal, havendo inibição parcial ou total desse processo (ROCHECOUSTE, 1967). COSSIO *et alii* (1977) estudando a tolerância a este herbicida, em cinco variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), observaram redução no perfilhamento das plantas tra

tadas. Mostraram ainda, a existência de algumas diferenças, na tolerância à ação do dalapon; a variedade NA56-79, em contraste com as demais variedades tratadas, mostrou ser uma das mais sensíveis ao herbicida. Em milho (*Zea mays*) e pepino (*Cucumis sativus*), o dalapon inibiu o alongamento das raízes primárias (INGLE e ROGERS, 1961). Doses não letais de dalapon reduzem progressivamente a taxa de crescimento de *Lemna minor* e *Salvinia natans* (PRASAD e BLACKMAN, 1965 a, b).

WILKINSON (1962) comparou os efeitos de diversas concentrações de dalapon, em diferentes tempos de exposição, cultivando cevada (*Hordeum vulgare*) em solução mineral nutritiva de Hoagland e Arnon. Dalapon mostrou-se tóxico na concentração de 143 ppm, quando as raízes das plantas foram expostas ao herbicida, por um tempo de 32 horas. As raízes expostas a 14,3 ppm de herbicida por 512 horas, originaram plantas raquíticas, de cor escura e com muitos rebentos. Uma queima progressiva, na base das folhas, indicou o efeito "tempo de exposição-concentração". O crescimento das plantas foi tanto mais afetado quanto maiores foram as relações "tempo de exposição-concentração" do herbicida.

NICKELL (1967 a) avaliou os efeitos de vários herbicidas em cultura de células, derivadas de 8 variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). Os efeitos sobre o crescimento e a resposta das diferentes variedades foram os pontos centrais de interesse. Possivelmente o achado mais importante

foi a consistente indução da diferenciação pelo dalapon. Isso aconteceu com as 8 variedades a uma concentração de 50 ppm. NICKELL (1967 b) estudou o efeito do dalapon sobre a indução de órgãos em cultura de tecidos da mesma planta. Os tecidos cultivados em meio básico contendo 2,4-D foram transferidos, após 3 semanas, para um meio livre desse regulador de crescimento. Os tecidos das variedades H.50-7209 e H.49-5 mostraram maior tendência a se diferenciar, mas às custas de um menor grau de crescimento. Também foram observadas variações de cor. Por outro lado, os tecidos da variedade H.39-7028 apresentaram tendência a aumentar seu crescimento. FAWCETT et alii, 1956, BARBA e NICKEL, 1969 e LIU et alii, 1972, também observaram o efeito do dalapon na indução de diferenciação e promoção do crescimento da planta.

O dalapon deve exercer seu efeito através de uma interferência na síntese do ácido pantotênico, um constituinte da coenzima A, muito importante metabolicamente. Esta sugestão foi originada do trabalho de HILTON et alii (1958), um estudo da ação de vários ácidos alifáticos clorados em levedura. O dalapon apresenta similaridade estrutural com os ácidos propiônico e acético, o que torna provável ser a sua fitotoxicidade causada por um deslocamento do ácido pantóico, impedindo a síntese do ácido pantotênico. KING e CHELDELIN (1948) observaram que o ácido propiônico não clorado interfere na síntese do ácido pantotênico. HILTON et alii (1958) primei

ramente demonstraram inibição do crescimento de levedura pelos ácidos acético, propiônico e isobutírico cloro substituídos. Os mesmos pesquisadores em trabalho posterior, mostraram a interferência do dalapon na síntese do ácido pantotênico, competindo com o ácido pantóico pela enzima de síntese do ácido pantotênico. Esta hipótese foi confirmada *in vitro* e implicou ser esta enzima, um dos mais importantes sítios de ação do dalapon (HILTON, 1958). MILLER (1958) fez uma comparação do conteúdo de ácido pantotênico em plantas forrageiras e cereais, mostrando maiores quantidades nas plantas mais resistentes ao dalapon.

WILKINSON (1962) mostrou que o dalapon não somente interfere no metabolismo do pantotenato, mas também no metabolismo do pivurato. Por outro lado observou que o herbicida não afeta a taxa de respiração, segundo a medição do consumo de oxigênio pela planta. McWHORTER (1961), BOURKE *et alii* (1964) e JAIN *et alii* (1966) também evidenciaram a influência do dalapon no metabolismo de carboidratos. Existem ainda evidências de sua ação sobre o metabolismo do nitrogênio (ANDERSEN *et alii*, 1962 e JAIN *et alii*, 1966), na síntese de lipídios e RNA, e na fotossíntese (ASHTON *et alii*, 1977).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Regeneração da planta em meio indutor da diferenciação celular e em presença de herbicidas

3.1.1. Obtenção dos explantes e indução de formação de calos na cultura de tecidos

Porções internodais (toletes) de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) variedade NA56-79 foram distribuídas em bandejas contendo vermiculite, e germinadas em câmara de crescimento Conviron, a 28^oC e com fotoperíodo de 12 horas de luz.

Após 20 dias de crescimento as plântulas foram

colhidas, e após a remoção de suas folhas, cortadas em segmentos de 5-6 cm de comprimento. Em seguida, foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio comercial a 20% (v/v), renovada por 6 vezes. Seguiu-se uma lavagem em água destilada corrente por 20 minutos, seguida da transferência do material para frascos contendo 200 ml da mesma solução de hipoclorito de sódio, e agitação (180 rpm) por 20 minutos.

Na câmara asséptica os segmentos foram transferidos para placas de Petri, contendo água destilada esterilizada, por 3 vezes, sequencialmente. Cada segmento foi, então, dividido em explantes de 1-2 cm de comprimento.

Foi preparado o meio básico de Murashige e Skoog modificado por CROCOMO *et alii* (1979) para indução da formação de calos (Meio Condicionador). O meio básico, além de sais minerais continha o seguinte (em 1 litro): sacarose 20 g, inositol 100 mg, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 3 mg, água de coco 19% e agar 8 g. O pH foi ajustado a 5,8 após a adição dos reguladores de crescimento. O meio de cultura foi distribuído em frascos de cultura do tipo "French Square", num volume de aproximadamente 10 ml. Os frascos, contendo o meio, foram autoclavados a 120°C e pressão de 1 atmosfera, durante 20 minutos.

Após a autoclavagem do meio os explantes foram nele inoculados em câmara asséptica, e então, incubados no escuro a uma temperatura de 24°C e por um período de 3 semanas.

Os calos então obtidos, foram divididos em porções de 1-2cm de diâmetro e reinoculados em novo Meio Condicionador. Os frascos foram expostos a luz fluorescente e incandescente por um período de 4 semanas e temperatura de 24^oC.

3.1.2. Regeneração da planta inteira a partir de calos tratados com herbicidas

Porções de calos com cerca de 1-2 cm de diâmetro foram colocadas em frascos do tipo "French Square" contendo o Meio Indutor de Planta modificado por CROCOMO *et alii* (1979), o qual continha além de sais minerais, o seguinte (em 1 litro): sacarose 20g, tiamina 1 mg, ácido naftalenoacético (NAA) 1 mg, cinetina 1 mg, inositol 100 mg, água de coco 19 %, caseína hidrolisada 400 mg e agar 8 g. O pH foi ajustado a 5,8. O meio foi então, acrescido de 20, 40, 80 ou 160 ppm dos herbicidas ametrin e dalapon e mais um grupo testemunha; cada grupo foi montado com 30 repetições. Os frascos assim preparados, permaneceram no ambiente de 24^oC e fotoperíodo de 12 horas.

Após 5 semanas, o material obtido, a parte aérea da planta regenerada, foi transferido para frascos maiores contendo o Meio Indutor de Raiz também modificado por CROCOMO *et alii* (1979), contendo os sais minerais e o seguinte (em 1

litro): sacarose 30 g, ácido indolilacético (IAA) 5 mg, cinetina 1 mg, inositol 1 g, caseína hidrolisada 2g, ácido nicotínico 0,5 mg, tiamina 0,5 mg, piridoxina 0,05 mg e agar 6 g. Foi mantido o mesmo esquema do tratamento anterior: 0, 20, 40, 80 ou 160 ppm de ametrin e dalapon, num mesmo número de repetições. Este tratamento prolongou-se por 4 semanas, no mesmo ambiente de 24⁰C e fotoperíodo de 12 horas.

3.1.3. Avaliação dos resultados

A regeneração da planta foi avaliada por medidas semi-quantitativas, através de análise visual. Nas primeiras cinco semanas de tratamento foram atribuídas notas semanalmente, com o objetivo de acompanhar e demonstrar tanto a regeneração quanto o desenvolvimento da parte aérea da planta. Foram também, fotografadas as repetições mais representativas de cada grupo de tratamento; desta mesma forma registrou-se, no final do experimento, a obtenção da planta inteira.

3.2. Efeito do ácido 2,2-dicloropropiônico (dalapon) sobre o comportamento fisiológico, teor de carboidratos e proteínas em plantas cultivadas em solução nutritiva, a pós terem sido regeneradas na cultura *in vitro*.

Foram regeneradas plântulas a partir de porções

de calos com cerca de 1-2 cm de diâmetro, colocadas em frascos do tipo "French Square", contendo o Meio Indutor de Planta modificado por CROCOMO *et alii* (1979). A regeneração aconteceu em sala de vegetação mantida a uma temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 horas.

Após 5 semanas, a parte aérea da planta regenerada, foi transferida para frascos maiores contendo o Meio Indutor de Raiz também modificado por CROCOMO *et alii* (1979) e mantidos no mesmo ambiente já descrito.

Depois de um período de 4 semanas, as plantas inteiras regeneradas foram transferidas para potes contendo vermiculite e mantidas em câmara de crescimento a 28°C e fotoperíodo de 12 horas. A irrigação diária foi feita com água destilada e a cada três dias com a solução nutritiva completa de HOAGLAND e ARNON (1950).

Após um período de crescimento de 4 semanas, as plantas com cerca de 20 cm de comprimento, foram transferidas para vasos contendo 4 l da solução nutritiva completa de HOAGLAND e ARNON (1950) em casa de vegetação. Após um período de mais 4 semanas, as plantas, distribuídas ao acaso, foram divididas em 6 grupos de 24, sendo cada planta colocada em vasos com 4 l da solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon contendo 0, 25, 50, 75 ppm de dalapon. Os seis grupos foram divididos segundo o tempo de exposição da raiz das plantas às dife

rentes concentrações do herbicida; os tempos foram de 2, 8, 32, 128, 512 h de exposição ou aquele grupo não exposto ao herbicida (testemunha). O experimento foi conduzido por 6 semanas em casa de vegetação. Quinzenalmente foram renovadas as soluções nutritivas livres do herbicida e aquelas contendo herbicida, segundo o tempo de exposição de cada grupo.

3.2.1. Avaliação do comportamento fisiológico das plantas

Semanalmente foram tomadas medidas do comprimento da parte aérea (da inserção do colmo e raiz à extremidade da folha mais longa) e da raiz (da mesma inserção a extremidade inferior da raiz). Foram também observados os efeitos do herbicida na morfologia e anatomia das plantas.

No final das seis semanas de experimento, as repetições mais representativas de cada grupo foram fotografadas. Depois disso, todas as plantas foram coletadas, dividindo-se em raízes e parte aérea (colmo+folhas). Cada uma das partes foi colocada em saquinhos de papel e pesada para obtenção do peso da matéria fresca. Em seguida, foram levados para estufa a 65°C e secas até peso constante para determinação do peso da matéria seca.

3.2.2. Análises

As análises da parte aérea e da raiz foram feitas com o material seco e moído em almofariz. As 6 amostras de cada grupo foram divididas em 2 amostras compostas de 3, e para cada uma delas foi feita análise com duas repetições.

3.2.2.1. Proteína

A porcentagem de proteína foi obtida a partir da porcentagem de nitrogênio total contida nas amostras, utilizando-se o fator de conversão 6,251.

3.2.2.1.1. Quantificação do nitrogênio total

a) Soluções empregadas

- *Solução digestora*: 175 ml de água destilada ;
1 g de selenito de sódio anidro; 21,39 g de Na_2SO_4 ; 4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ e 200 ml de H_2SO_4 concentrado.

- *Solução de ácido bórico com indicador*: 20 g de H_3BO_3 ; 15 ml de verde de Bromocresol a 0,1% e 5 ml de vermelho de metilo a 0,1% em etanol absoluto; completar a 1000 ml com água destilada.

- Solução de NaOH 12N

- Solução de H₂SO₄ 0,1N

b) Técnica

O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl. Amostras de 100 mg de material seco foram colocadas em balões Kjeldahl contendo 7 ml de solução digestora e submetidas a digestão até se obter uma solução incolor. O amônio de cada solução foi separado por destilação em presença de NaOH 12N. O amônio foi coletado em um Erlenmeyer contendo 10 ml da solução de ácido bórico com indicador. Depois disso, o amônio foi titulado com H₂SO₄ 0,1N até o indicador de solução mudar de cor (verde para marrom claro). A porcentagem de nitrogênio foi calculada a partir do volume de H₂SO₄ 0,1N necessário para titular o amônio da amostra.

3.2.2.2. Açúcares solúveis em álcool

3.2.2.2.1. Extração

Amostras de 100 mg de material seco foram extraídas com 4 ml de etanol a 80% em banho de água a 85^oC por 15 minutos. Logo após o resfriamento, as suspensões foram centri-

fugadas a 6000 rpm por 10 minutos. A fração líquida coletada em tubos e o sedimento reextraído por mais duas vezes com volumes de 3 ml de etanol cada vez. O volume final foi completado a 10 ml usando etanol a 80%. O extrato obtido foi usado para quantificação de açúcares solúveis totais e açúcares redutores.

3.2.2.2.2. Quantificação dos açúcares solúveis totais

a) Soluções empregadas

- *Solução de fenol a 5%.*

b) Técnica

Os açúcares solúveis totais foram quantificados pelo método do fenol-sulfúrico descrito por DUBOIS *et alii* (1956). Do extrato de açúcares solúveis em álcool foram tomadas alíquotas de 0,1 ml, colocadas em tubo de ensaio e completadas a 0,5 ml com água destilada. Juntou-se 0,5 ml de solução de fenol a 5% com agitação e, a seguir, acrescentou-se 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado, também em agitação. Após 20 minutos, as

soluções foram lidas a 490 nm contra um branco preparado com água destilada e os outros reagentes. O valor de absorbância foi comparado com uma curva padrão de glucose.

3.2.2.2.3. Quantificação dos açúcares redutores

a) Soluções empregadas

- *Reagente Somogyi*: 24 volumes de solução A (25 g de tartarato de sódio e potássio + 20g de NaHCO_3 + 200 g de Na_2SO_4 em 1 l de água) e 1 volume de solução B (15 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ em 100 ml de água).

- *Reagente de Nelson*: 25 g de molibdato de amônio; 21 ml de H_2SO_4 concentrado e 3 g de $\text{Na}_2\text{A}_5\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 500 ml de água destilada.

b) Técnica

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método de NELSON (1944). Os volumes das alíquotas foram de 0,2 e 1 ml para os extratos da parte aérea e raízes respectivamente. As alíquotas da parte aérea foram completadas a 1 ml com água destilada. Depois disso, foi acrescentado 1 ml de reagente de Somogyi, misturando-se bem. Os tubos contendo a mistura da reação foram tapados com bolas de vidro e colocados em

banho de água a 100 °C por 10 minutos. Logo após o resfriamento, adicionou-se 1 ml do reagente de Nelson. As soluções foram agitadas e adicionados 4 ml de água destilada em cada tubo de ensaio. A leitura das soluções foi feita a 520 nm contra um branco, onde o volume de amostra foi substituído por água destilada. O valor de absorbância foi interpolado em uma curva padrão de glucose.

3.2.3. Análise estatística dos resultados

Os pesos fresco e seco das plantas colhidas, e ainda, o conteúdo em proteína e açúcares solúveis em álcool (açúcares totais e redutores), foram comparados estatisticamente através de análise inteiramente casualizada, com parcelas subdivididas. O teste de Tukey foi aplicado para comparação das médias dos tratamentos.

Para o comprimento da parte aérea e raiz foi feita análise de perfil, considerando 20 grupos (dose x tempo) avaliados em 5 medições semanais após início dos tratamentos. Foram testadas as seguintes hipóteses.

1 - Analogia entre grupos (H_{01})

O objetivo foi avaliar possíveis similaridades entre grupos para as variáveis estudadas.

2 - Contraste entre grupos, fixadas as semanas (S1, S2, S3, S4 e S5) após a exposição das plantas ao herbicida (Ho₂)

O objetivo foi avaliar diferenças entre os grupos de cada uma das cinco semanas de experimentação. Este tipo de hipótese é independente da aceitação ou rejeição da analogia.

Para cada hipótese testada, o programa utilizado fornece valores da estatística F calculada.

Todos os testes estatísticos foram considerados significativos ao nível de 5% de probabilidade.

4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Regeneração da planta em meio indutor da diferenciação celular e em presença de herbicidas

Neste ensaio foram adicionados aos meios básicos de cultura os herbicidas ametrin e dalapon, em diferentes concentrações (vide ítem 4.1). O comportamento das plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp var. NA56-79) em regeneração, avaliado através das notas, medidas semi-quantitativas, encontra-se indicado por frequências nas Tabelas 1 e 2.

Os calos da variedade NA56-79 transferidos para meio indutor de planta, contendo o herbicida dalapon, mostrou

TABELA 1 - Frequência das notas referentes à morfogênese da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. var. NA56-79) em meio indutor da diferenciação celular e em presença de diferentes concentrações de ametrin.

SEMANAS DE TRATAMENTO	ESCALA DAS NOTAS	AMETRIN (ppm)				
		0	20	40	80	160
1	0	-	-	-	-	-
	1	50,00	30,00	73,34	82,76	86,67
	2	46,67	56,67	13,33	17,24	13,33
	3	-	13,33	13,33	-	-
	4	3,33	-	-	-	-
2	0	3,33	3,33	6,67	-	-
	1	23,33	13,33	16,67	55,17	73,33
	2	6,67	6,67	33,33	37,93	26,67
	3	40,00	63,34	40,00	6,90	-
	4	26,67	13,33	3,33	-	-
3	0	4,17	-	-	-	-
	1	20,83	3,58	47,83	80,77	100,00
	2	-	14,28	8,70	-	-
	3	16,67	50,00	39,13	19,23	-
	4	58,33	32,14	4,34	-	-
4	0	-	-	-	-	-
	1	13,04	4,76	43,75	76,92	100,00
	2	4,35	9,52	-	-	-
	3	21,74	47,62	37,50	23,08	-
	4	60,87	38,10	18,75	-	-

Escala das notas:

- 0 - presença de primórdios radiculares
- 1 - de 1 a 5 aglomerados de células clorofiladas
- 2 - acima de 5 aglomerados de células clorofiladas
- 3 - brotação incipiente
- 4 - brotação intensa.

TABELA 2 - Frequência das notas referentes à morfogênese da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. var. NA56-79) em meio indutor da diferenciação celular e em presença de diferentes concentrações de dalapon.

SEMANAS DE TRATAMENTO	ESCALA DAS NOTAS	DALAPON (ppm)				
		0	20	40	80	160
1	0	-	-	-	-	-
	1	20,69	40,00	20,69	85,72	89,66
	2	41,38	45,00	44,83	14,28	10,34
	3	31,03	10,00	34,48	-	-
	4	6,90	5,00	-	-	-
2	0	3,45	-	-	-	-
	1	6,90	8,67	17,24	80,77	82,76
	2	-	10,00	34,48	19,23	17,24
	3	20,70	40,00	48,28	-	-
	4	68,95	43,33	-	-	-
3	0	-	-	-	-	-
	1	3,45	16,67	44,83	96,15	100,00
	2	-	-	31,03	3,85	-
	3	10,34	76,67	24,14	-	-
	4	86,21	6,66	-	-	-
4	0	-	10,34	31,03	-	-
	1	-	17,24	65,52	100,00	100,00
	2	-	-	-	-	-
	3	6,90	62,08	3,45	-	-
	4	93,10	10,34	-	-	-

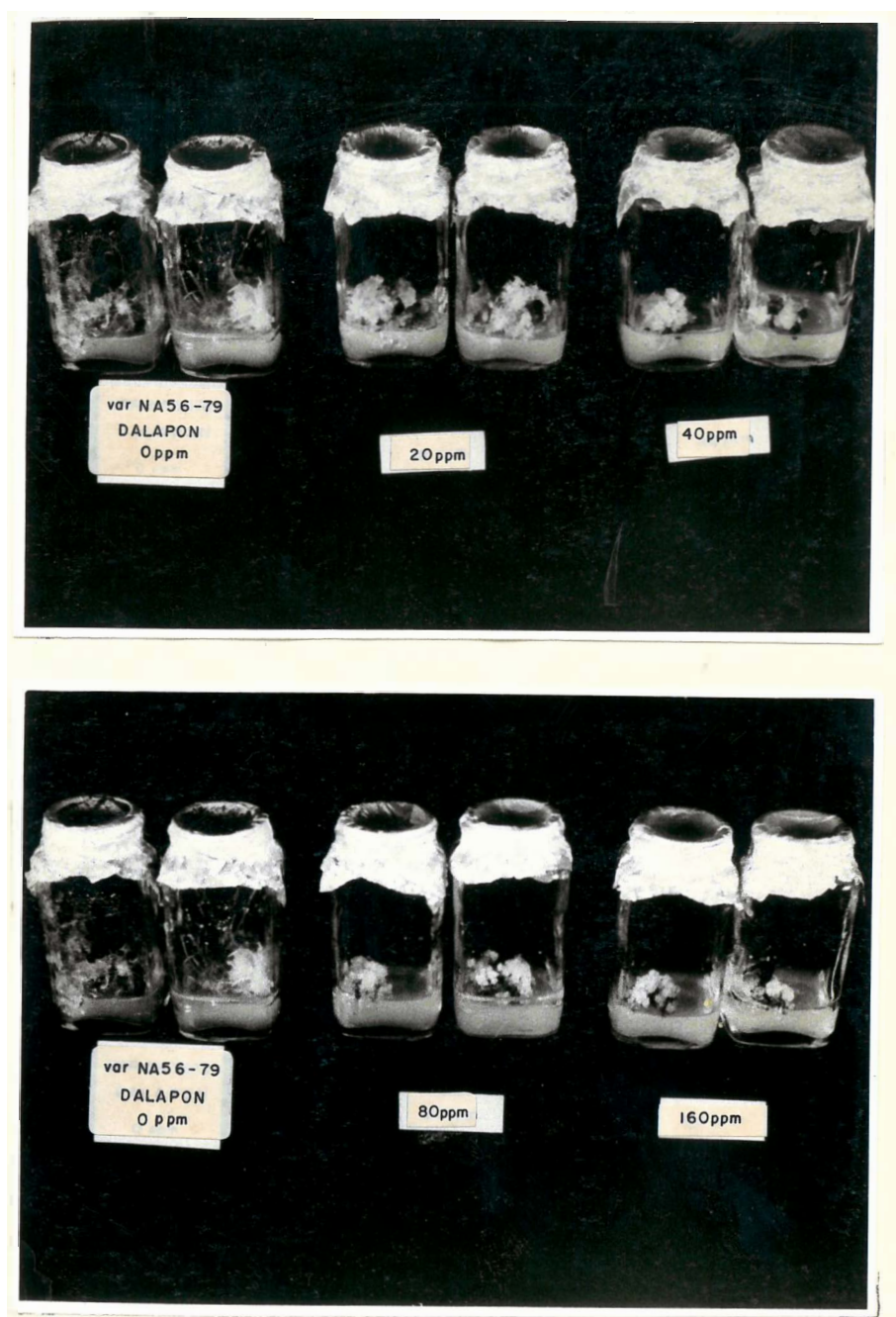
Escala das notas:

- 0 - presença de primórdios radiculares
- 1 - de 1 a 5 aglomerados de células clorofiladas
- 2 - acima de 5 aglomerados de células clorofiladas
- 3 - brotação incipiente
- 4 - brotação intensa

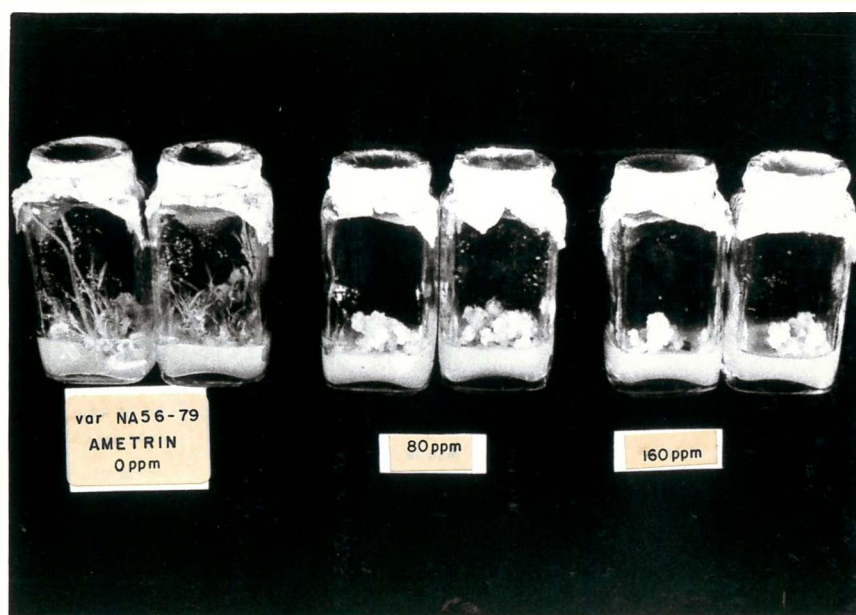
uma mais intensa formação de pontos verdes (aglomerados de células clorofiladas) e brotos, principalmente na concentração de 20 ppm e nas duas semanas iniciais do tratamento. Nas duas semanas posteriores, o número de brotos diminuiu, não havendo regeneração de plantas em nenhuma concentração do herbicida. A planta mostrou-se mais tolerante ao herbicida ametrin, pois no final de quatro semanas deste tratamento, o número de brotos foi maior nas concentrações de 20 e 40 ppm. Nestas concentrações houve a regeneração da planta inteira, que aconteceu de maneira mais significativa na concentração de 20 ppm do herbicida; a frequência na regeneração de plantas diminuiu com o aumento da concentração do herbicida triazínico. O comportamento resultante de ambos os tratamentos, pode ser melhor visualizado através das Figuras 1 a 4.

A regeneração da planta inteira apresentou o mesmo comportamento da regeneração da parte aérea, e pode ser visualizado nas Figuras 5 a 7.

Assim, na obtenção de plantas tolerantes aos herbicidas na cultura de tecidos, o comportamento das mesmas não foi semelhante aquele encontrado por CROCOMO *et alii* (1981a, b), que no cultivo de calos utilizaram a mesma variedade de cana-de-açúcar, os mesmos herbicidas, nas mesmas concentrações. Segundo esses autores, na produção de calos, dos compostos testados o que teve maior efeito deletério sobre a produção de matéria seca foi o ametrin. No presente trabalho, on



FIGURAS 1 e 2 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20 40, 80 e 160 ppm) de dalapon na regeneração *in vitro* da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. var. NA56-79).



FIGURAS 3 e 4 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20,40, 80 e 160 ppm) de ametrin na regeneração *in vitro* da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. var. NA56-79).



var NA56-79
DALAPON
0 ppm

20 ppm

FIGURA 5 - Influência do dalapon (grupo controle e 20 ppm) sobre a regeneração da planta inteira (parte aérea+ raiz) de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. var. NA56-79) na cultura de tecidos.



FIGURAS 6 e 7 - Influência do ametrin (grupo controle, 20 e 40 ppm) sobre a regeneração da planta inteira (parte aérea+raiz) de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.var. NA56-79) na cultura de tecidos.

de foi estudada a regeneração de plantas, o efeito do ametrin não foi tão marcante, pois foram obtidas plantas inteiras em concentrações de até 40 ppm deste herbicida.

Sabe-se que os herbicidas triazínicos tem mostrado efeitos inibitórios sobre todos os órgãos de plantas intactas, e que isso tem sido atribuído à inibição da fotossíntese como sítio comum de ação deste grupo de compostos (ASHTON e CRAFTS, 1973). Poder-se-ia esperar por isso, um efeito mais pronunciado do ametrin sobre a célula em diferenciação, principalmente daquela já diferenciada, onde o aparelho fotossintético encontra-se funcional. Como isto não foi observado, devem ser verdadeiras as conclusões obtidas por ASHTON e CRAFTS(1977), de que os herbicidas triazínicos inibem não somente a fotossíntese, mas a síntese de proteína, RNA e lipídios. ASHTON e URIBE, 1962, JORDAN *et alii*, 1966, EBERT e VAN ASSCHE, 1969, CROCOMO *et alii*, 1981a e OCHOA-ALEJO, 1983, propuseram também, outros sítios de ação do ametrin, além daquele já conhecido, ao observarem inibição no crescimento de células de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) aclorofiladas.

Em adição, NADAR *et alii* (1975) observaram ainda, uma promoção no crescimento de culturas de calos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), pelo uso de doses não letais de herbicidas triazínicos. DE VRIES, 1963, GOREN e MONSELISE, 1965 e FRENEY, 1965, observaram que a estimulação ou inibição

do crescimento, depende da concentração do herbicida e da variedade de planta utilizada.

O dalapon, de ação mais controversa que o herbicida triazínico, apresenta efeito sobre diversos eventos bioquímicos, acarretando diversos sintomas como inibição do crescimento, clorose foliar, necrose e eventualmente a morte das plantas (McWHORTHER, 1961; INGLE e ROGERS, 1961; ANDERSEN *et alii*, 1962; PRASAD e BLACKMAN, 1965a, b; ASHTON e CRAFTS, 1973; COSSIO *et alii*, 1977). Contudo NICKELL (1967b) observou que o dalapon em uma concentração de 50 ppm induziu na cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) a organogênese e crescimento de células em cultura de tecidos. FAWCETT *et alii*, 1956; WILKINSON, 1962, BARBA e NICKELL, 1969 e LIU *et alii*, 1972, também obtiveram o mesmo resultado. No presente trabalho de regeneração de plantas de cana-de-açúcar tolerantes a este herbicida, o resultado obtido não foi o mesmo, pois nem mesmo na mais baixa dose (20 ppm) não foi obtida a planta inteira regenerada. Esta observação mostrou-se concordante ao trabalho de CROCOMO *et alii* (1981a), no qual foi testado o efeito do herbicida sobre a cultura de células de cana-de-açúcar não diferenciadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho sobre regeneração de plantas em presença dos herbicidas triazínico (ametrin) e ácido alifático clorado (dalapon), e aqueles acima citados estão indicando variação somaclonal das plan

tas regeneradas na cultura de tecidos. Consideramos essa explicação baseado nas evidências de que o simples uso da técnica de regeneração de plantas possa originar populações de indivíduos, que contenham uma grande variabilidade genética, ou seja, ocorre variação somaclonal. Assim, a cultura de tecido, pode ser usada para induzir variabilidade genética, ou para manifestar variabilidade genética natural já existente, como naqueles trabalhos relatados por LIU *et alii*, 1972 e 1981; EVANS *et alii*, 1981 e CROCOMO *et alii*, 1984.

4.2. Efeito do ácido 2,2-dicloropropiônico (dalapon) sobre o comportamento fisiológico, teor de carboidratos e proteínas em plantas cultivadas em solução nutritiva, após terem sido regeneradas na cultura *in vitro*

4.2.1. Efeito sobre o crescimento e morfologia das plantas

As Figuras 8 a 13 representam o efeito das diferentes relações "tempo de exposição-concentração" do herbicida no comprimento (centímetros) da parte aérea (colmo+folhas) e raiz das plantas. A produção de matéria fresca e seca das plantas é mostrada nas Figuras 14 e 15.

As plantas de cana-de-açúcar da variedade NA56-79 empregadas, mostraram-se susceptíveis à ação fitotóxica do

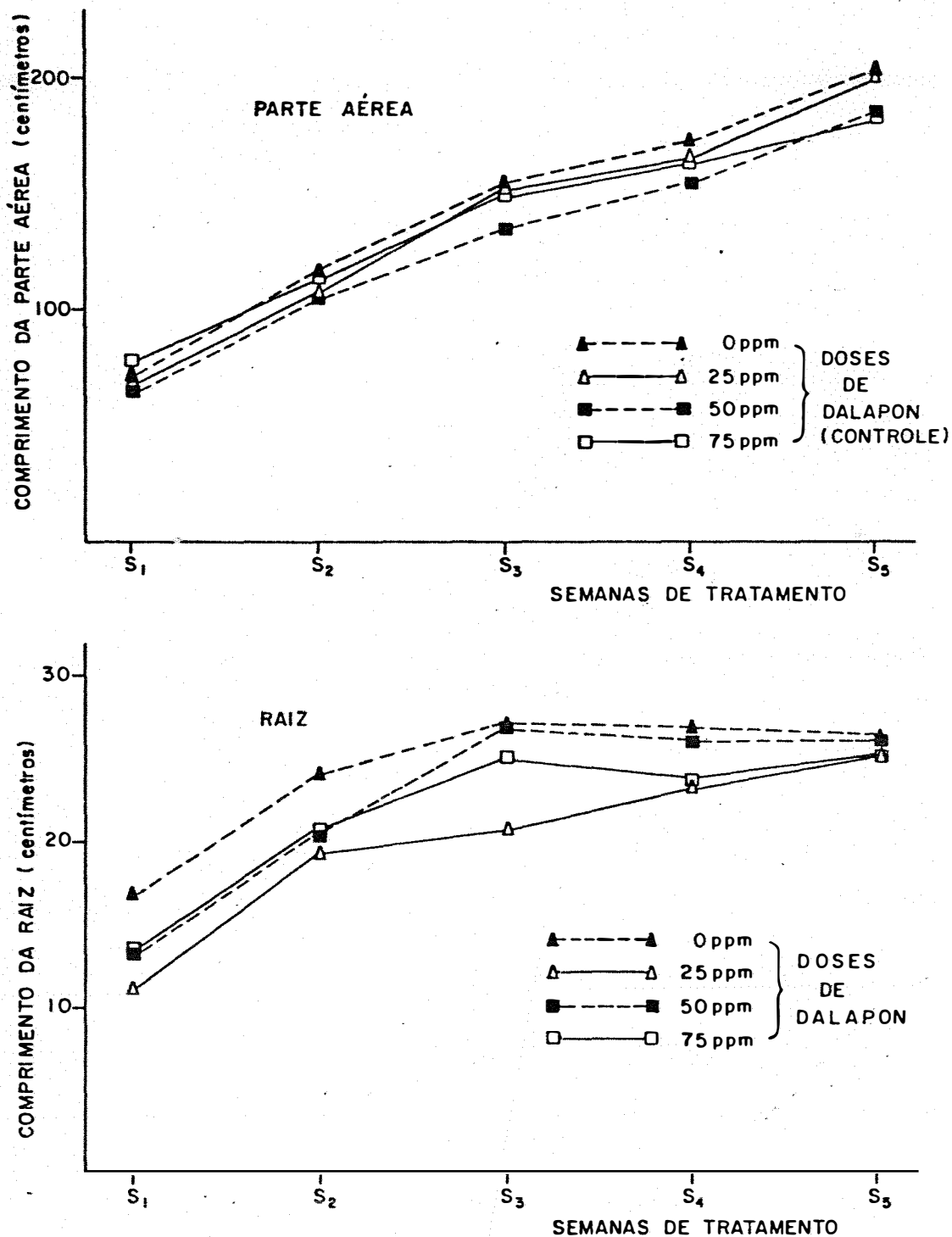


FIGURA 8 - Valores médios do comprimento da parte aérea (colmo + folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos cultivadas em solução nutritiva e não tratadas com dalapon (GRUPOS CONTROLE).

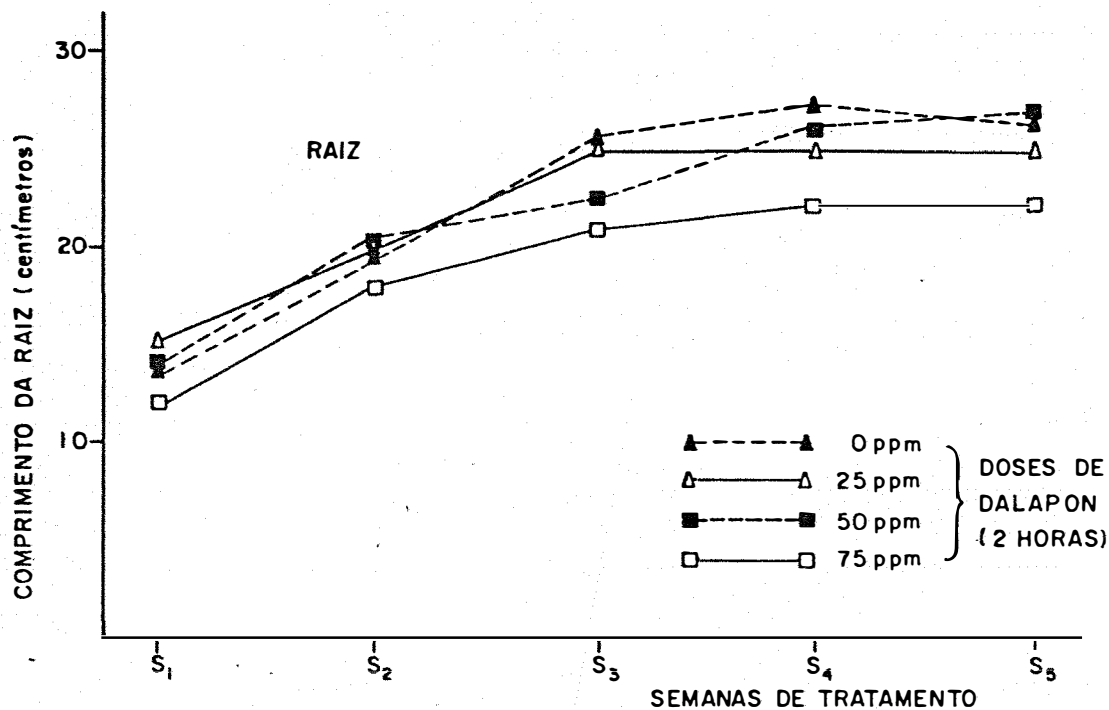
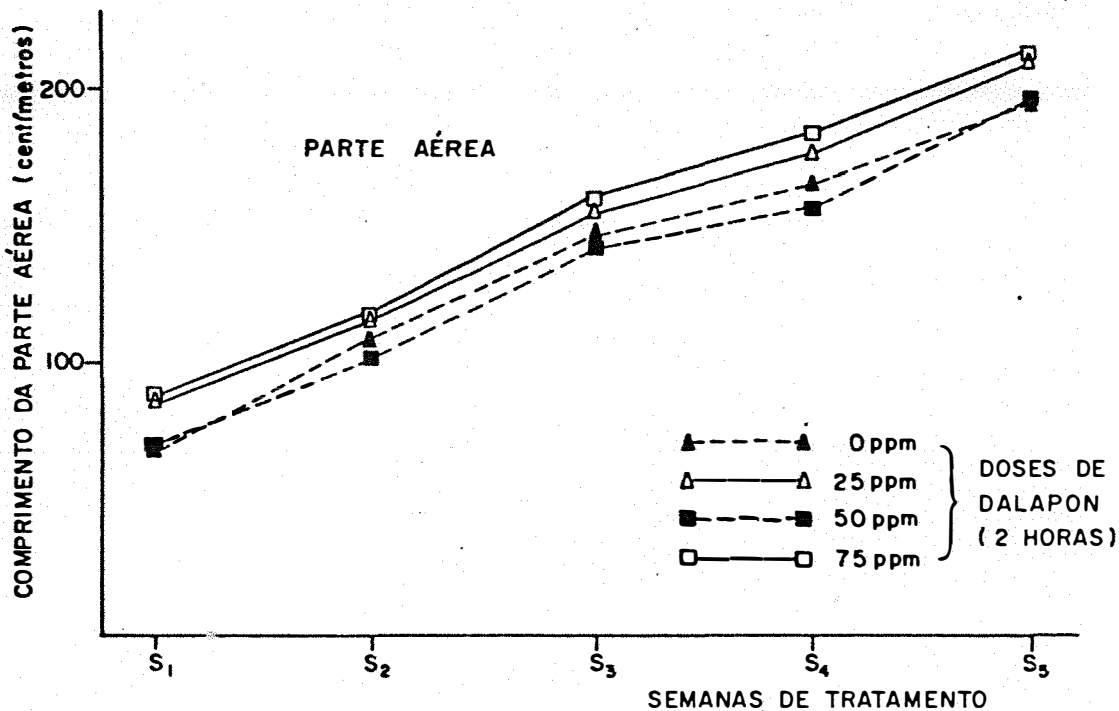


FIGURA 9 - Valores médios do comprimento da parte aérea

(colmo + folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos, cultivadas em solução nutritiva e tratadas com dalapon por um TEMPO DE EXPOSIÇÃO ao herbicida de 2 HORAS.

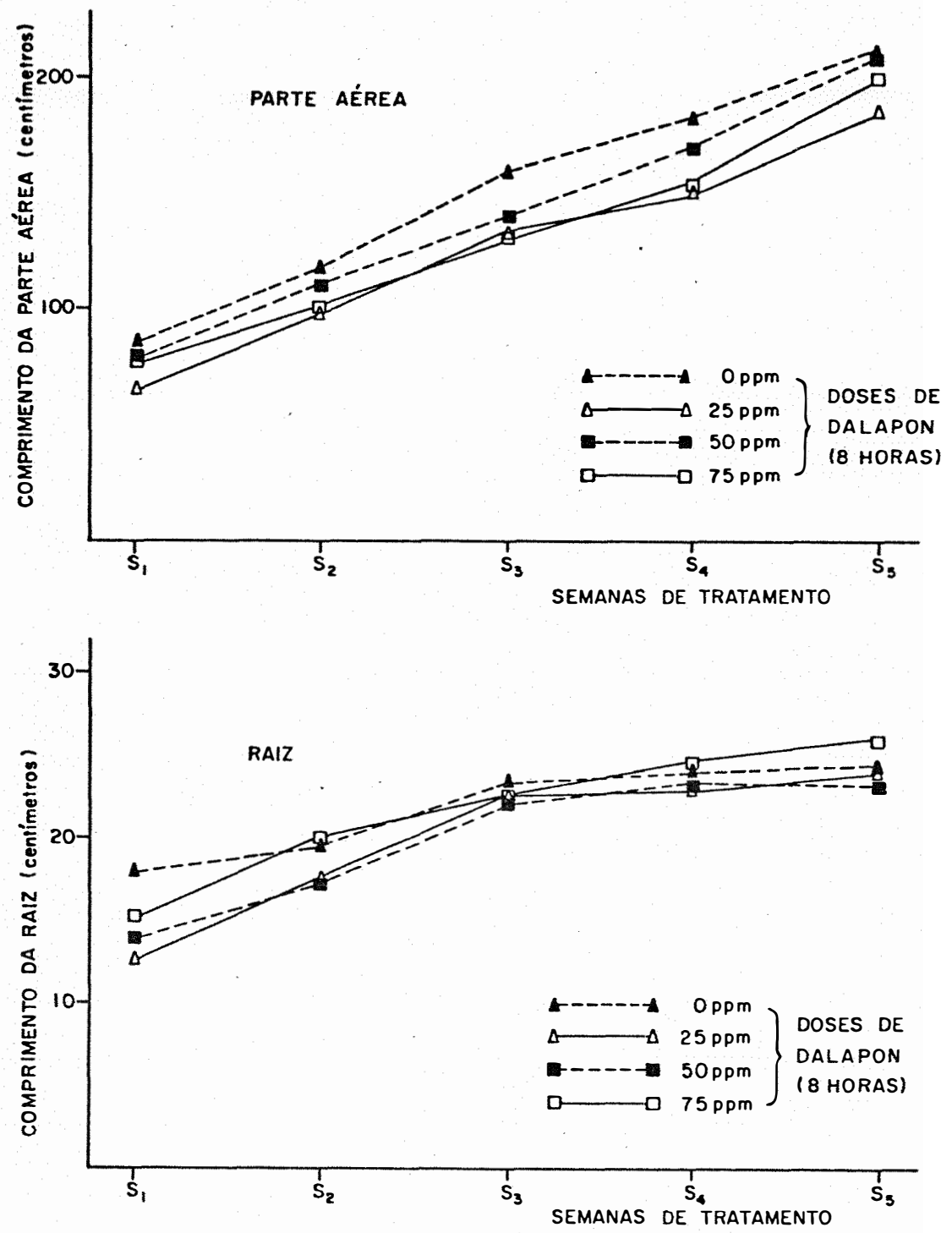


FIGURA 10 - Valores médios do comprimento da parte aérea (colmo + folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos, cultivadas em solução nutritiva e tratadas com dalapon por um TEMPO DE EXPOSIÇÃO ao herbicida de 8 HORAS.

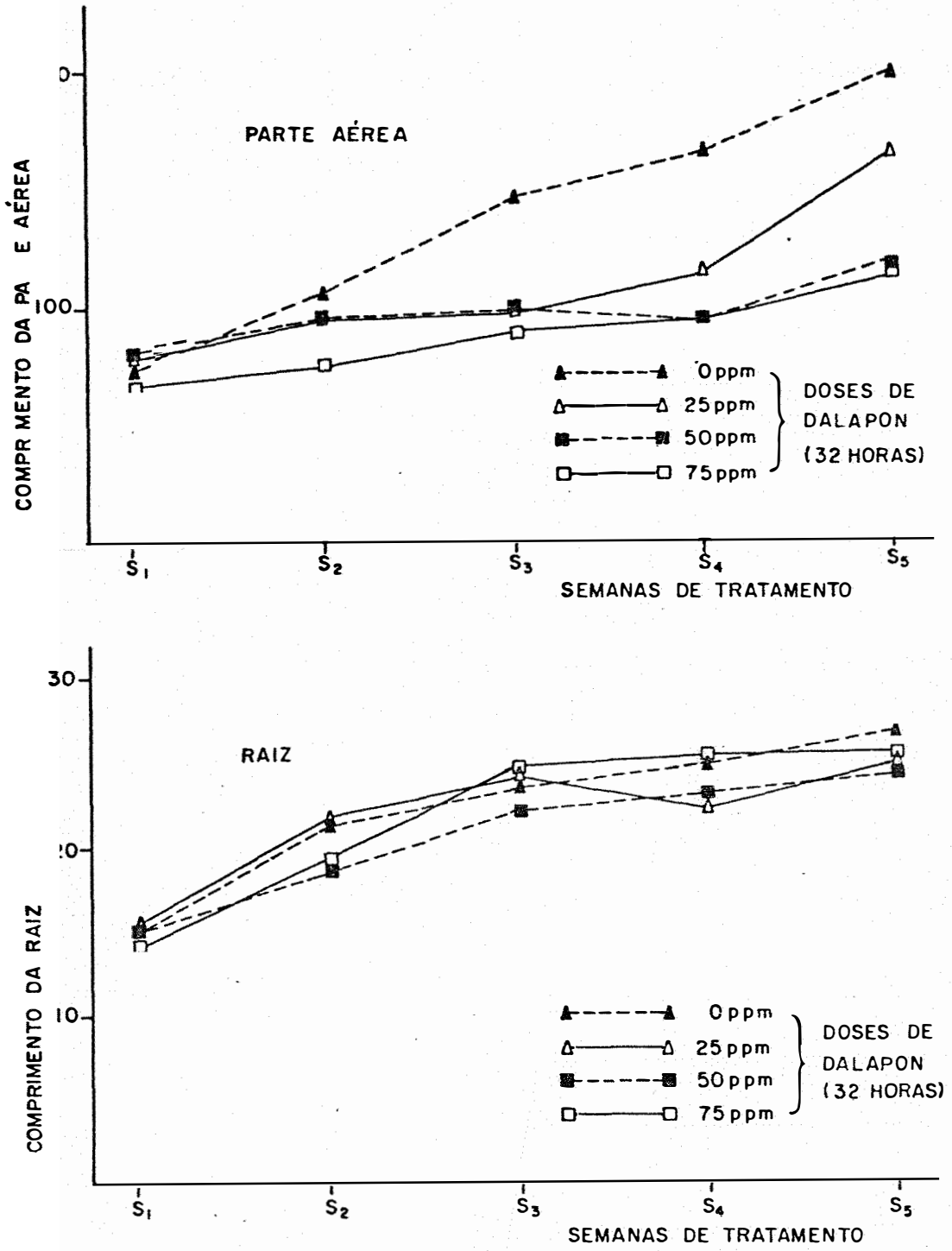


FIGURA 11 - Valores médios do comprimento da parte aérea (caomo + folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos, cultivadas em solução nutritiva e tratadas com dalapon por um TEMPO DE EXPOSIÇÃO ao herbicida de 32 HORAS.

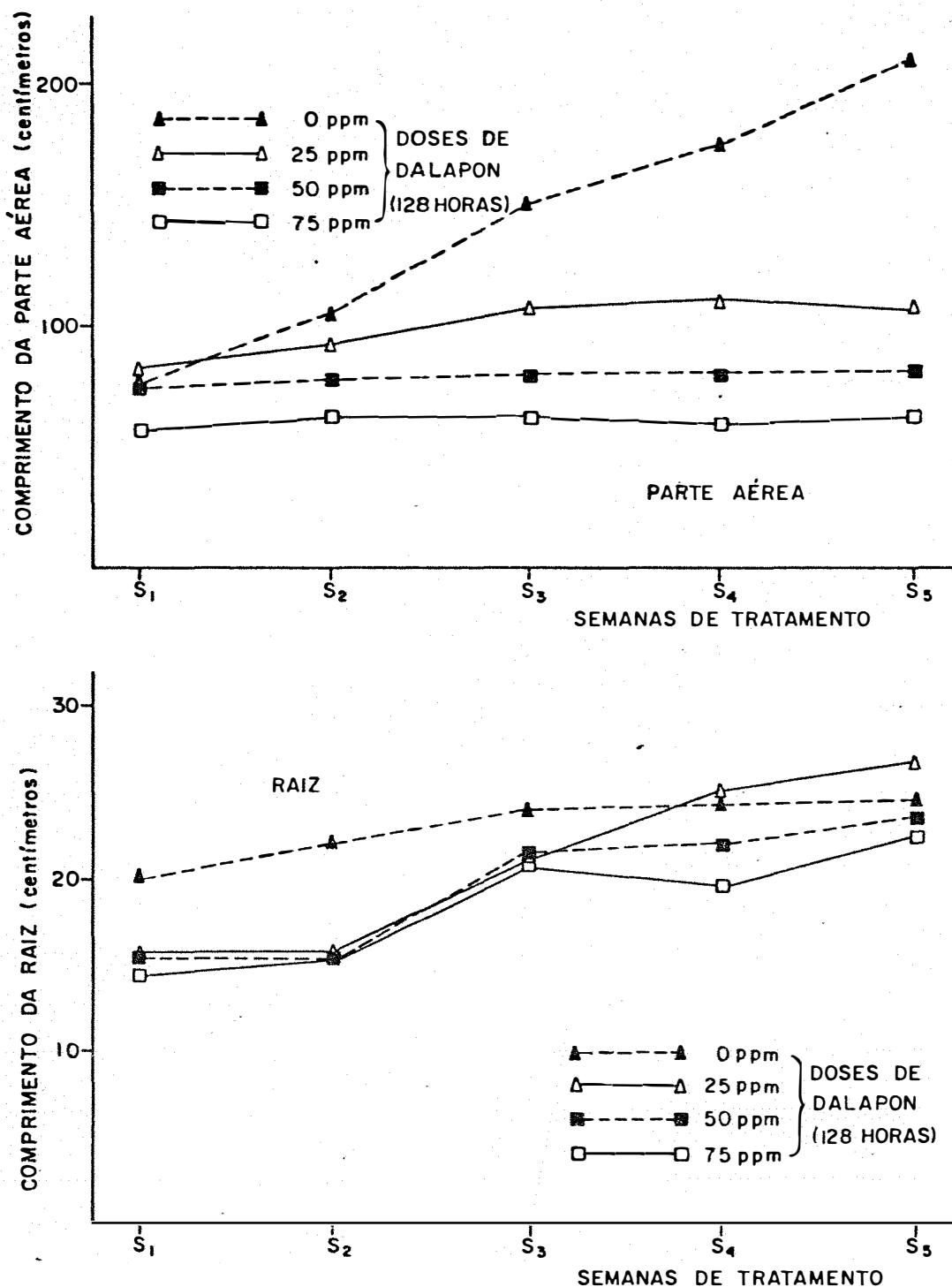


FIGURA 12 - Valores médios do comprimento da parte aérea

(caímo + folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos, cultivadas em solução nutritiva e tratadas com dalapon por um TEMPO DE EXPOSIÇÃO ao herbicida de 128 HORAS.

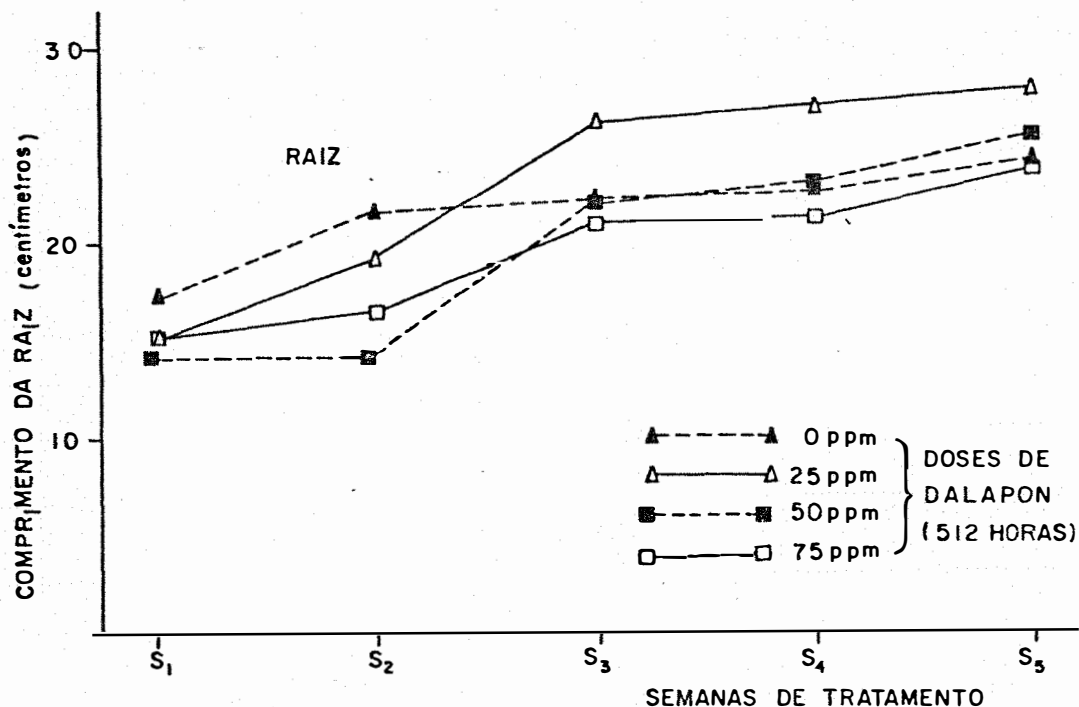
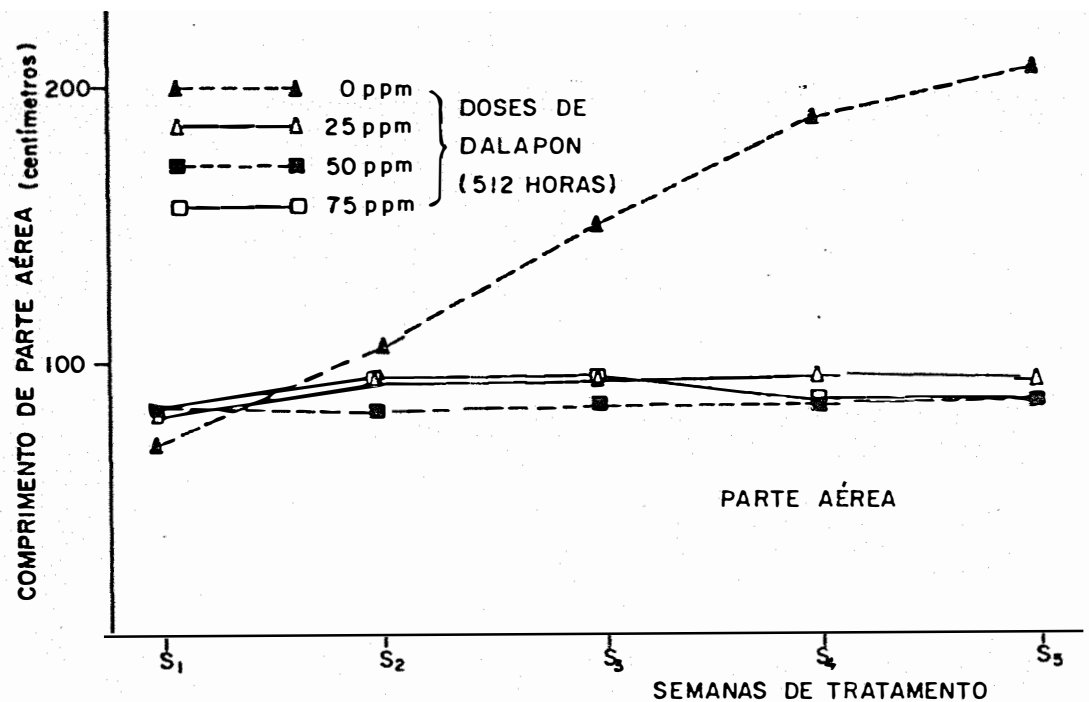


FIGURA 13 - Valores médios do comprimento da parte aérea (colmo + folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos, cultivadas em solução nutritiva e tratadas com dalapon por um TEMPO DE EXPOSIÇÃO ao herbicida de 512 HORAS.

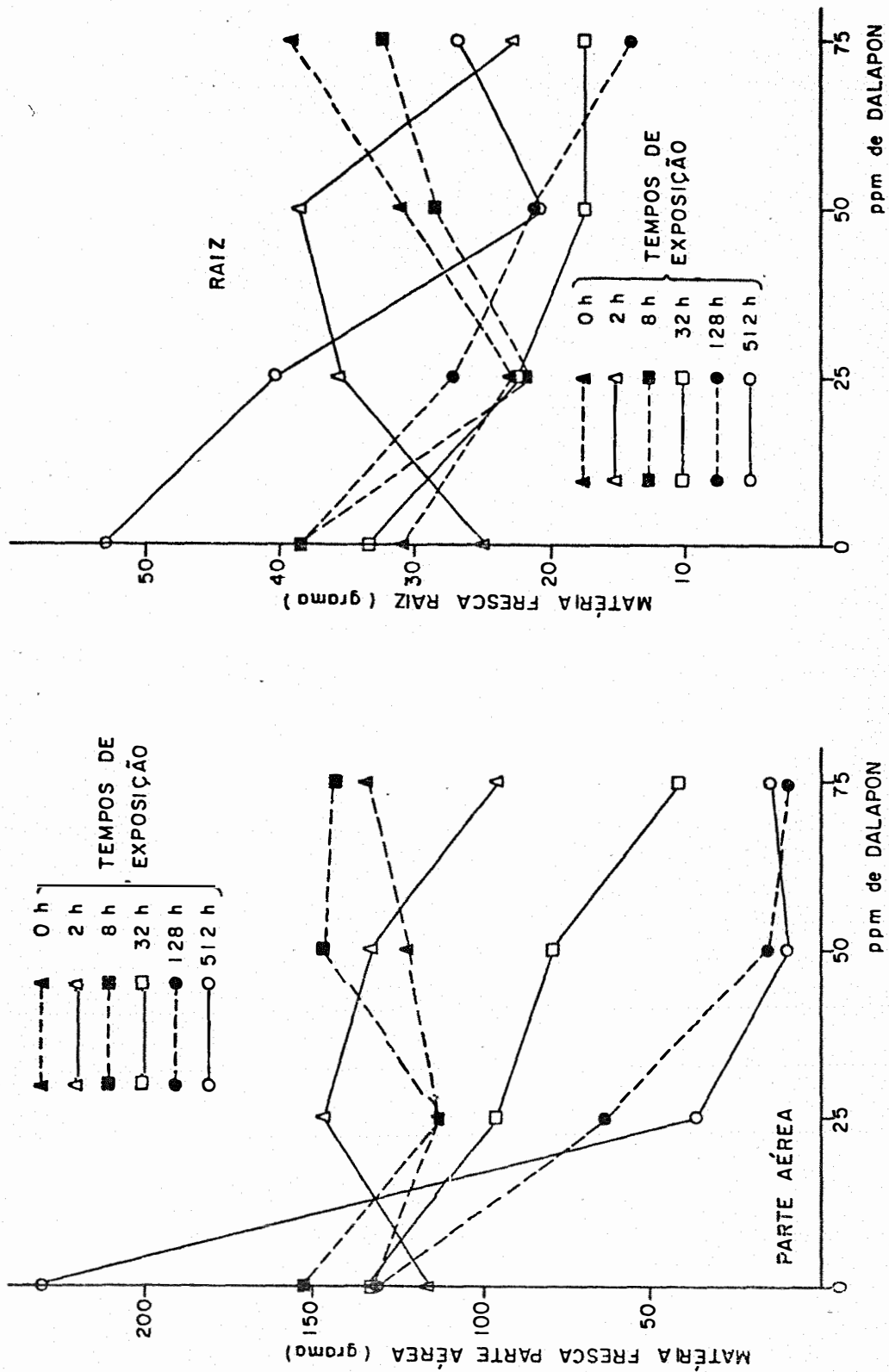


FIGURA 14 - Efeito das diferentes concentrações de dalapon sobre a produção de MATERIA FRESCA na parte aérea (colmo + folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva.

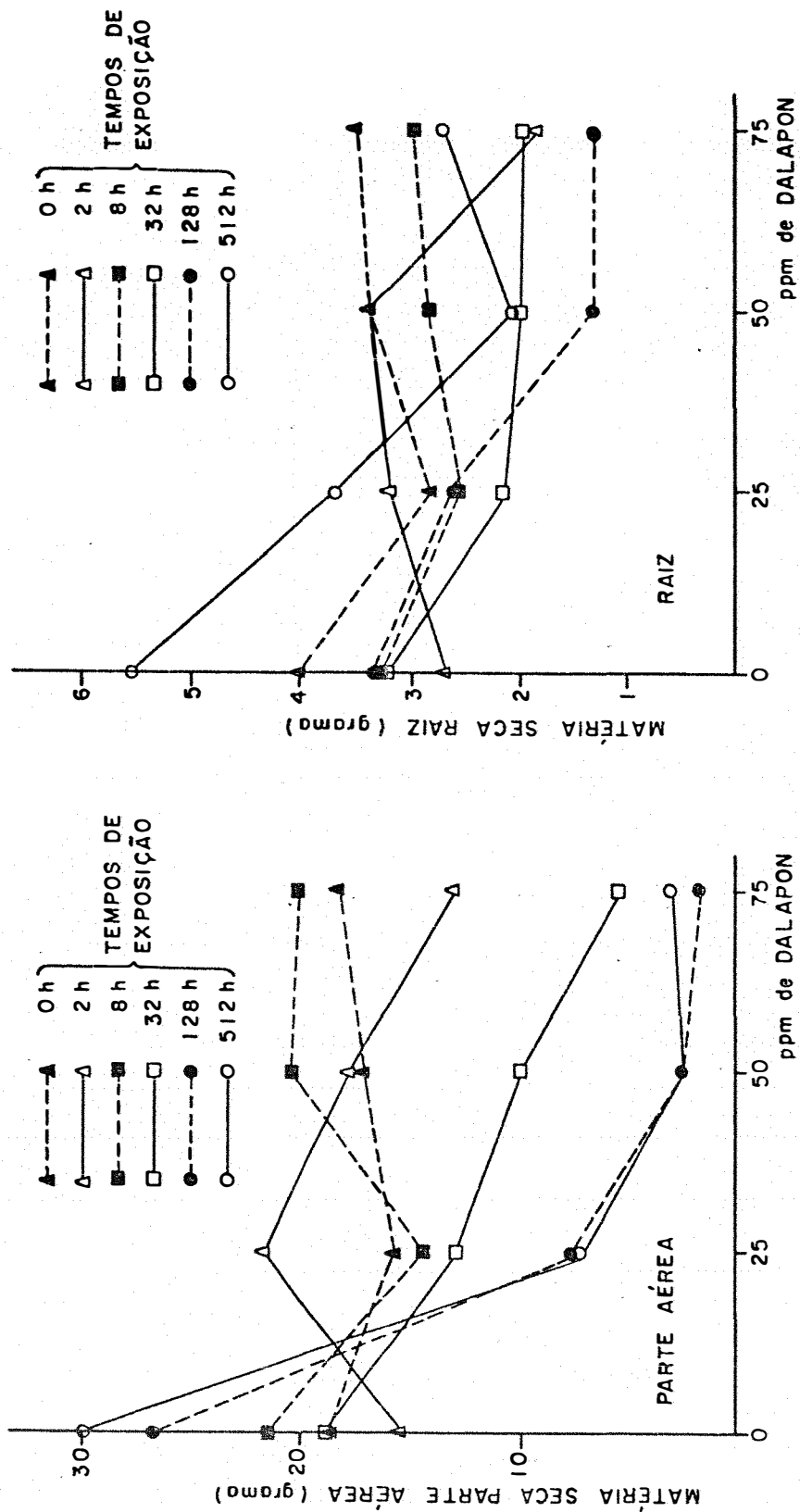


FIGURA 15 - Efeito das diferentes concentrações de dalapon sobre a produção de MATERIA SECA na parte aérea (colmo + folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva.

dalapon. No decorrer das 5 semanas de tratamento, o efeito deletério do herbicida foi sendo pronunciado, principalmente naquelas plantas expostas ao dalapon por tempos superiores a 32 horas. Observar os resultados da análise estatística resumidos nas Tabelas 3 e 4. O efeito inibitório do crescimento das plantas tratadas mostrou-se consistente em qualquer das doses de dalapon empregadas e em tempos de exposição superiores a 32 horas. A análise de perfil, aplicada para se contrastar estatisticamente as médias de comprimento, não mostrou diferença significativa entre as mesmas. Isto pode ser explicado pela grande variância em comprimento dentro de cada grupo de plantas regeneradas na cultura de tecidos, e então, cultivadas na solução nutritiva na presença de herbicida.

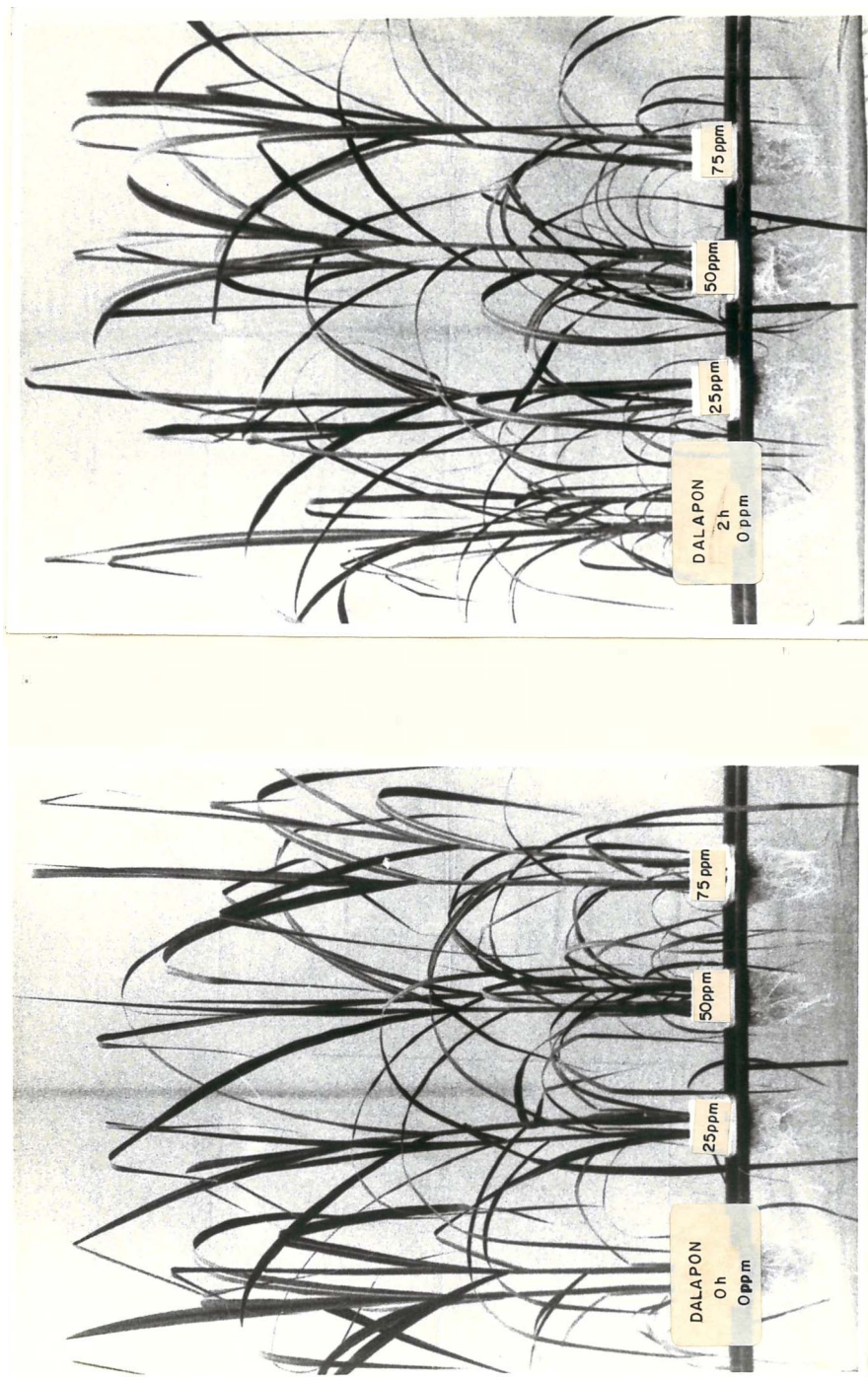
O efeito inibidor do crescimento, pelo crescente aumento na dosagem de dalapon, mostrou-se mais evidente na parte aérea das plantas, onde também foram observados alguns efeitos teratogênicos do herbicida em concentração superior a 25 ppm e tempo de exposição superior a 32 horas. As plantas nessas condições mostraram-se raquíticas e as folhas deformadas, necrosadas nas extremidades e numa coloração verde mais escura que o normal. Exposições de 32, 128 e 512 horas causaram progressivamente maior injúria na parte aérea das plantas assim tratadas.

O efeito deletério nas raízes foi menor que a

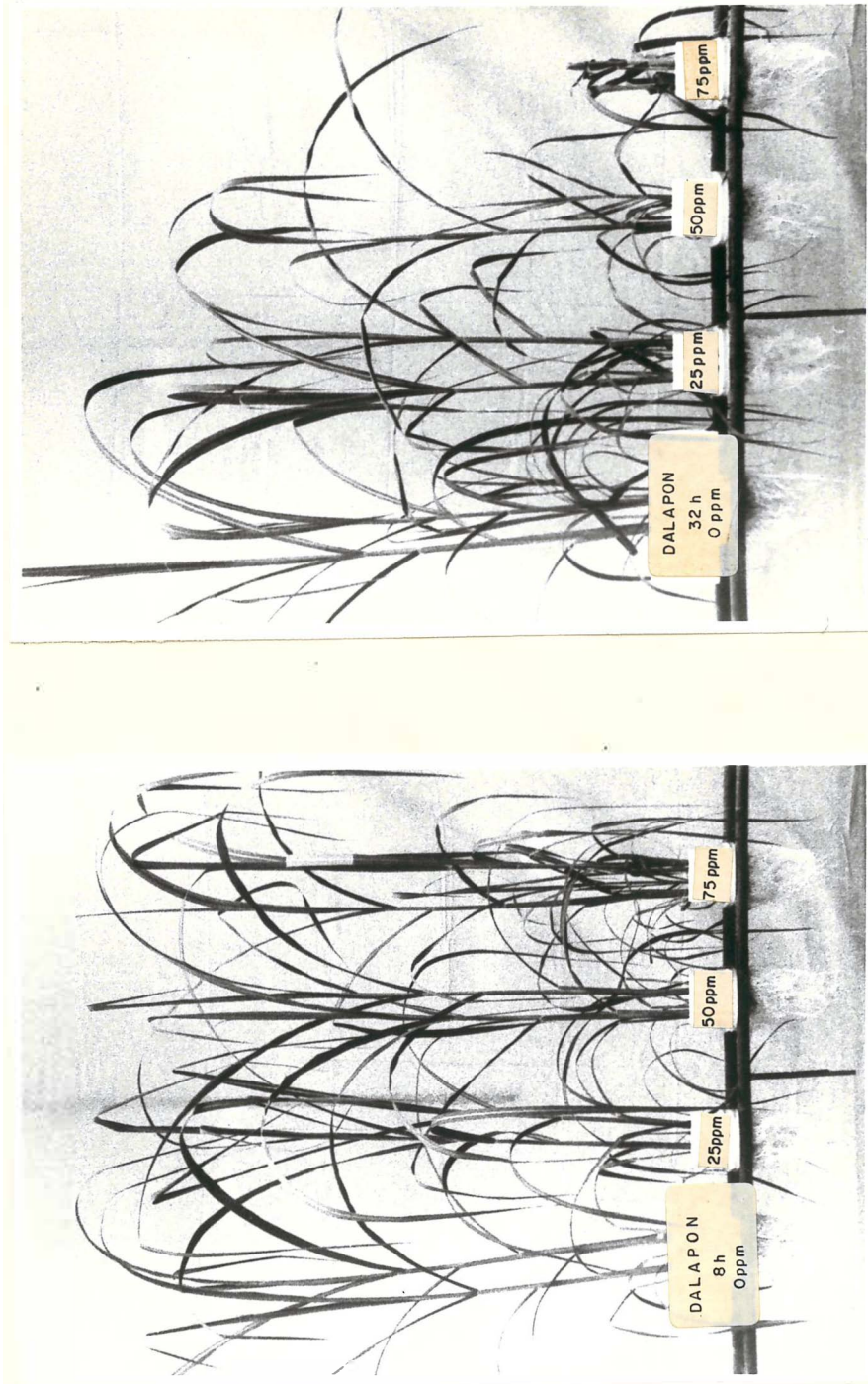
quele observado na parte aérea das plantas. As raízes apresentaram crescente inibição de formação nos tempos de exposição de 128 e 512 horas, acentuando-se com a dosagem crescente de dalapon. Os aspectos anatômicos e de crescimento descritos podem ser visualizados nas Figuras 16 a 21.

O resultado obtido pode ser explicado pelo fato do herbicida ter sido aplicado nas raízes das plantas, sendo então, absorvido e translocado à folhagem pelo mecanismo fisiológico da transpiração. Desta forma, o herbicida deve ter-se acumulado em concentrações fitotóxicas, no interior da folhagem (o uso do termo "acumulado" não implica em acúmulo fisiológico no interior do vacúolo; acúmulo, como usado aqui, é meramente um aumento na concentração interior da folha). O resultado é semelhante ao encontrado por COSSIO *et alii* (1977) num trabalho onde verificou a tolerância ao dalapon por diferentes variedades de cana-de-açúcar cultivadas na Argentina. FOY (1961a, b) mostrou que o movimento do dalapon deve ser restrito ao meristema intercalar em folhas de gramíneas. Isso pode esclarecer o resultado encontrado, pois o dalapon deve ter-se movido para as folhas em uma taxa maior que a taxa de detoxificação normal ocorrente na planta.

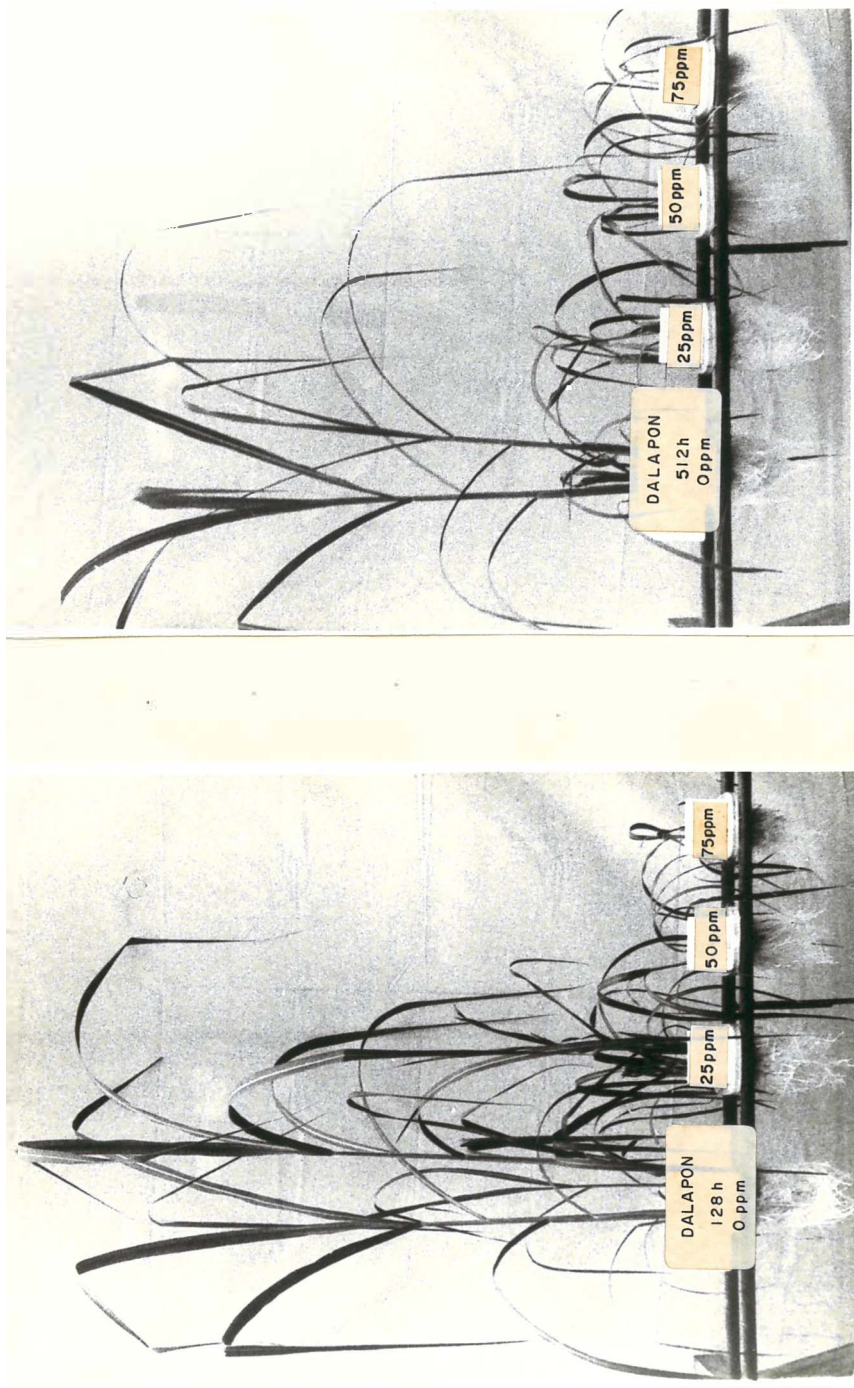
Os valores de matéria fresca e seca acompanhados dos testes estatísticos são descritos nas Tabelas 5 a 8, embora não permitam uma correlação precisa entre a produção de massa vegetal e os diferentes "tempos de exposição-concentra



FIGURAS 16 e 17 - Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. var. NA56-79) regenerada da cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva com platea de Hoagland e Arnon, na presença de diferentes concentrações de dalapon (0, 25, 50 e 75 ppm) nos tempos de 0 (grupo controle) e 2 horas de exposição das raízes ao herbicida.



FIGURAS 18 e 19 - Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. var. NA56-79) regeneradas na cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon, na presença de diferentes concentrações de dalapon (0, 25, 50 e 75ppm) nos tempos de 8 e 32 horas de exposição das raízes ao herbicida.



FIGURAS 20 e 21 - Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. var. NA56-79) regenera das na cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon, na presença de diferentes concentrações de dalapon (0, 25, 50 e 75 ppm) nos tempos de 128 e 512 horas de exposição das raízes ao herbicida.

ção" do herbicida, confirmam contudo, o efeito deletério do dalapon já observado no crescimento (comprimento) das plantas.

Os sintomas fitotóxicos obtidos confirmam parcialmente aqueles encontrados por ASHTON e CRAFTS (1973) que verificaram inibição de crescimento, clorose foliar e más formações, especialmente na região apical da parte aérea. ROCHE COUSTE (1967) constatou injúria produzida pelo dalapon durante o brotamento normal, havendo inibição parcial ou total desse processo. INGLE e ROGERS (1961) observaram inibição do alongamento de raízes primárias em milho (*Zea mays*) e pepino (*Cucumis sativus*). PRASAD e BLACKMAN (1965a, b) verificaram que doses não letais de dalapon reduzem progressivamente a taxa de crescimento de *Lemna minor* e *Salvinia natans*. WILKINSON (1962) cultivando cevada (*Hordeum vulgare*) em solução nutritiva na presença de diferentes concentrações de dalapon em diferentes tempos de exposição da raiz. O dalapon mostrou-se tóxico na concentração de 143 ppm, quando as plantas foram expostas ao herbicida por um tempo de 32 horas. As raízes expostas a 14,3 ppm do herbicida por 512 horas, originaram plantas raquíticas de cor escura e com muitos rebentos. O crescimento das plantas foi tanto mais afetado quanto maiores foram as relações "tempo de exposição-concentração" do herbicida.

Segundo NICKELL (1967); BARBA e NICKELL (1969) e LIU *et alii* (1972), doses não letais de dalapon promovem uma consistente indução da diferenciação e crescimento da planta

de cana-de-açúcar. Estas observações não foram constatadas no presente trabalho e também naqueles de CROCOMO *et alii* (1981a, b) quando verificaram o efeito do mesmo herbicida na cultura de células não diferenciadas de plantas de cana-de-açúcar. Como a cultura de tecido pode induzir variabilidade genética, ou manifestar variabilidade genética natural já existente (LIU *et alii*, 1972, 1981; EVANS *et alii*, 1981 e CROCOMO *et alii*, 1984), podemos sugerir portanto, variação somaclonal das plantas regeneradas em cultura de tecido e em seguida cultivadas em solução nutritiva na presença do herbicida dalapon.

4.2.2. Influência no teor de proteína

As médias estimadas dos teores de proteínas (mg/100 mg de matéria seca) na parte aérea e raiz das plantas são, assim como os respectivos testes estatísticos, descritos nas Tabelas 9 e 10.

De acordo com a análise estatística, os conteúdos de proteína das plantas tratadas (25, 50, 75 ppm de dalapon) e das plantas controle (0 ppm de dalapon) foram significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade. A Figura 22 e o teste de Tuckey aplicado mostram um crescente aumento no conteúdo de proteína, proporcional ao aumento do "tempo de exposição - concentração" do herbicida. A diferença é mais consistente nas plantas tratadas com herbicida na concentração de

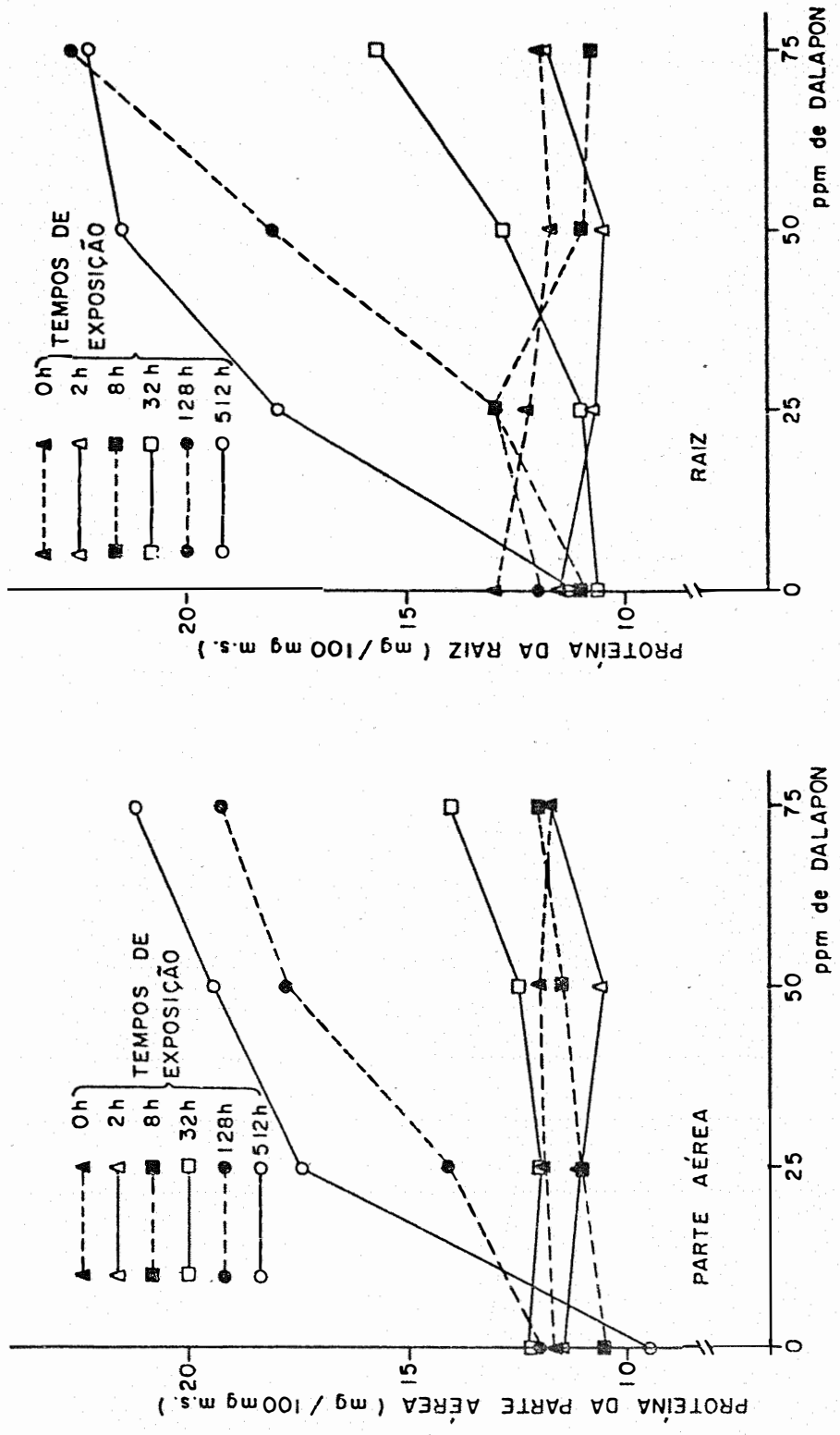


FIGURA 22 - Conteúdo de PROTEÍNAS na parte aérea (colmo + folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de dalapon.

25 ppm e tempo de exposição de raiz de 128 horas. Nas concentrações de 50 e 75 ppm o aumento do teor de proteína torna-se evidente a partir do tempo de 32 horas de exposição ao herbicida.

O método empregado na análise de proteínas foi aquele descrito por Kjeldahl, onde o teor da proteína é estimado segundo o conteúdo de nitrogênio total. Assim o efeito do dalapon incrementando o conteúdo proteico estimado, deve ser devido à ação do herbicida na degradação de proteínas, o que leva a um aumento nos níveis de aminoácidos livres e amidas (ANDERSEN *et alii*, 1962). MASHTAKOV e MOSHCHUK (1967) também relataram uma elevação nos níveis de amônia livre em plantas tratadas com dalapon. ASHTON e CRAFTS (1973) sugeriram ainda que o sítio primário da ação do dalapon está associado à mudança da estrutura das proteínas. Isto implica em que o aparente aumento no conteúdo proteico pode não refletir a realidade, pois o método empregado mede a quantidade de nitrogênio total, independente deste ter feito parte de uma estrutura proteica ou de outra molécula nitrogenada qualquer da planta analisada. Embora não seja possível afirmar-se seguramente que o dalapon exerce um efeito estimulante de produção de proteína, pode-se observar um efeito marcante deste herbicida no aumento do conteúdo de nitrogênio total na planta.

4.2.3. Efeito sobre o teor de açúcares solúveis totais e redutores.

Os resultados de açúcares solúveis totais e redutores da parte aérea (colmo + folhas) e raiz das plantas são, juntamente com os respectivos testes estatísticos, resumidos nas Tabelas 11 a 14.

A parte aérea das plantas tratadas mostrou, de maneira geral, discreta diminuição ou nenhuma correlação dos níveis de açúcares solúveis totais com o incremento de dalapon na solução nutritiva (Figura 23). As plantas expostas ao herbicida por um tempo de 8 horas constituíram uma exceção, apresentando um aumento progressivo nos níveis de açúcares solúveis totais com o crescente aumento nas concentrações de dalapon empregadas. Essa mesma influência foi observada nas raízes das plantas tratadas, onde não se pode obter correlação entre os teores de açúcares solúveis totais e os diferentes "tempos de exposição - concentração" do herbicida. Uma única exceção deve-se às plantas expostas ao dalapon por um tempo de 2 horas, onde observou-se pequeno aumento no teor de açúcares solúveis totais com a elevação das doses do herbicida. Este efeito contudo, não foi observado ao ser empregada a dose de 75 ppm de dalapon. A estatística empregada a um nível de 5% de probabilidade confirma o observado.

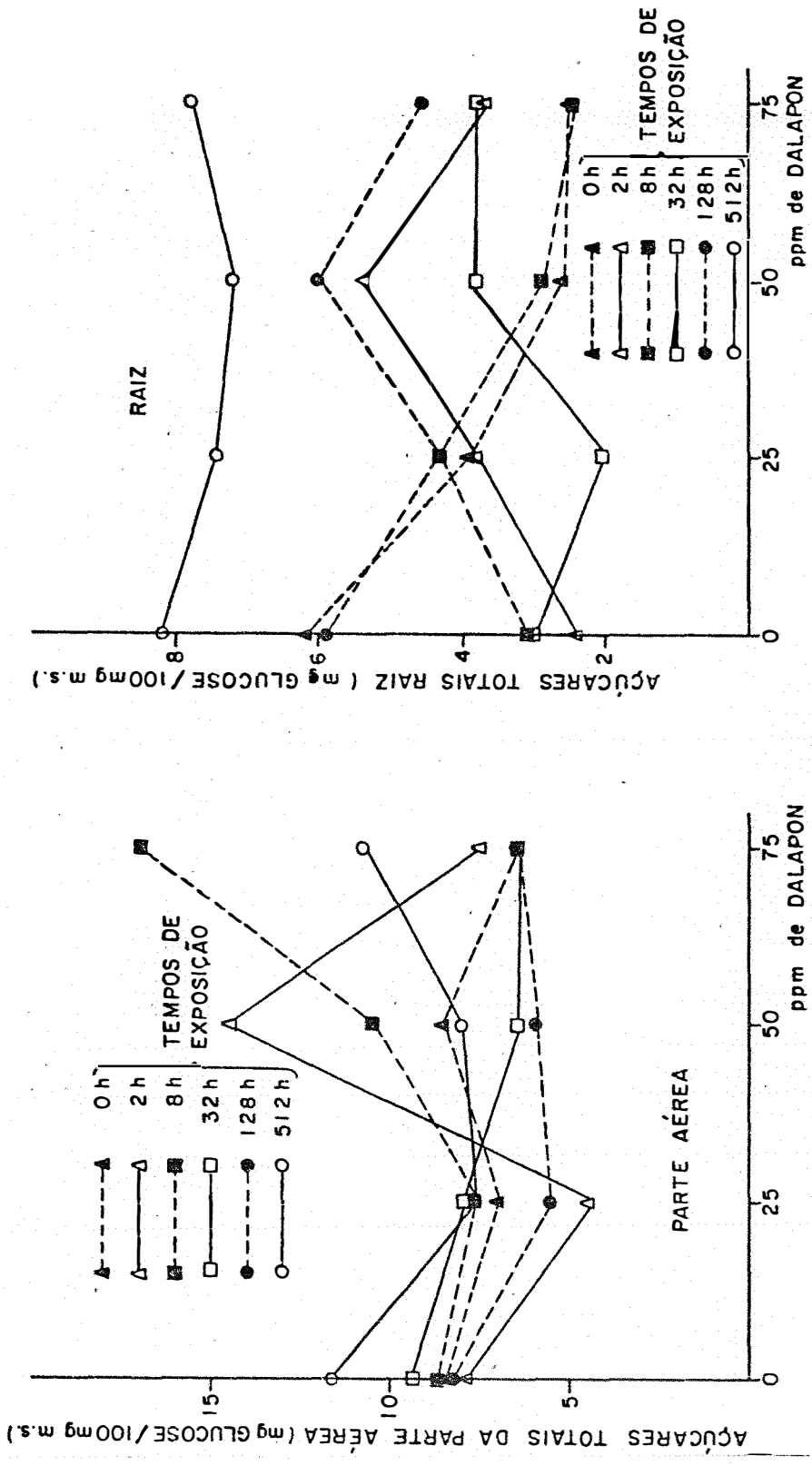


FIGURA 23 - Efeito das diferentes concentrações de dalapon sobre o conteúdo de AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS na parte aérea (colmo+folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva.

Os níveis de açúcares redutores foram maiores na parte aérea das plantas expostas ao dalapon por 32 e 128 horas (Figura 24). A diferença contudo, não é significativa ao nível de 5% de probabilidade e nem é possível fazer-se uma correlação das doses de herbicida e os níveis de açúcares redutores obtidos. As raízes das plantas expostas ao herbicida por 2 horas mostraram aumento discreto no teor de açúcares redutores, embora não significativo estatisticamente e decrescendo na dosagem de 75 ppm de dalapon a um valor inferior ao das plantas controle (0 ppm de dalapon). Os demais tempos de exposição também mostram valores de açúcar redutor que não se correlacionam com as crescentes doses de herbicida.

Assim, de maneira geral, o teor de açúcares redutores não apresentou aumento significativo. Alguns relatos sugerem que o dalapon influencia o metabolismo de carboidratos (McWHORTER, 1961; BOURKE *et alii*, 1964; JAIN *et alii*, 1966 e CROCOMO *et alii*, 1981a, b) bloqueando a glicólise e o ciclo de Krebs, levando a um acúmulo de açúcares simples em culturas de células não diferenciadas ou em plantas propagadas de maneira convencional. Essas observações contudo, não foram obtidas no presente trabalho. Essa mudança de comportamento fisiológico pode ser explicada pelo fato de que o simples uso da técnica da regeneração de planta *in vitro*, pode originar populações

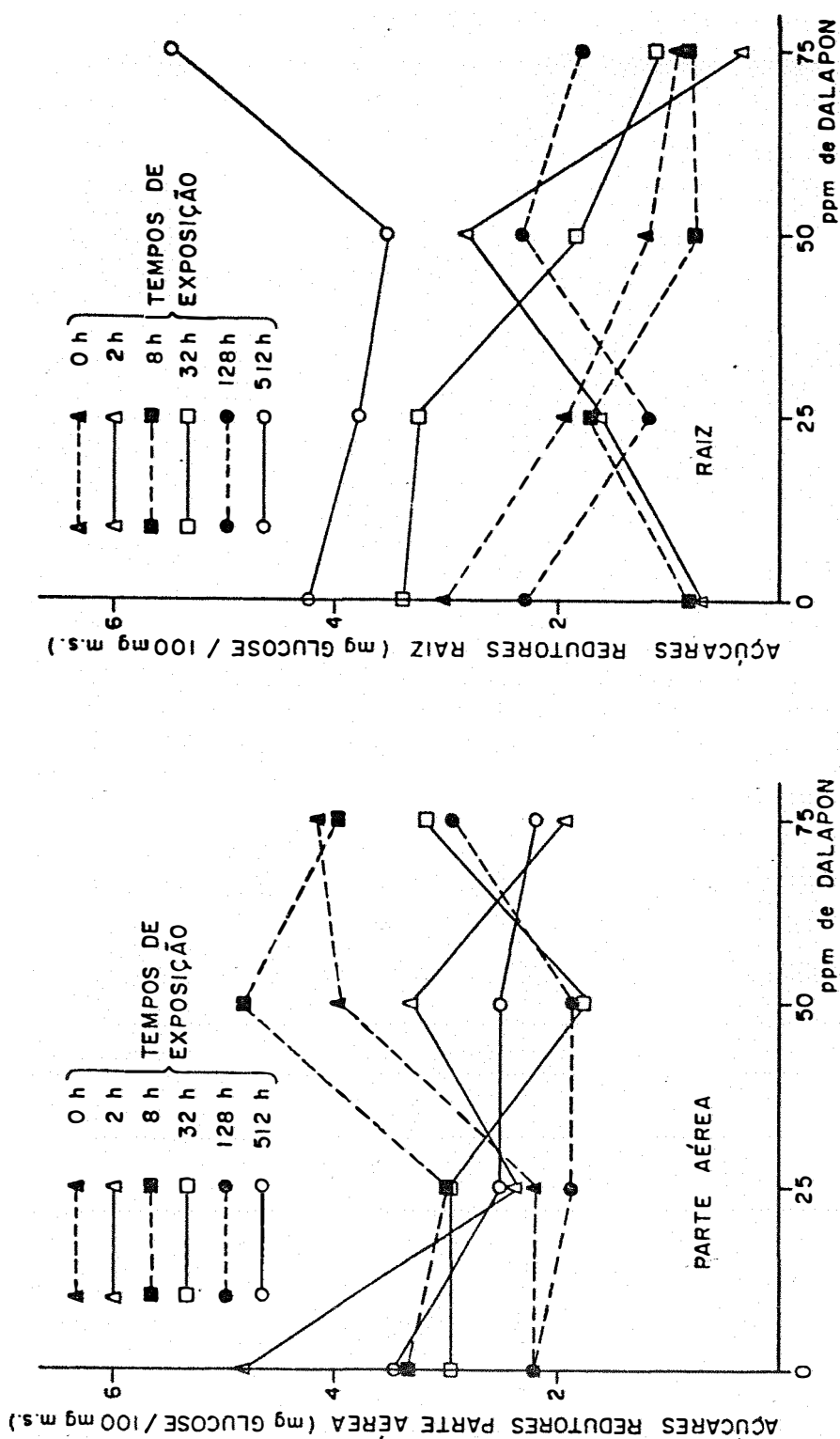


FIGURA 24 - Influência das diferentes concentrações de dalapon sobre o teor de AÇÚCARES REDUTORES na parte aérea (colmo + folhas) e raiz de plantas de cana-de-açúcar regeneradas em cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva.

de indivíduos, que contenham uma grande variabilidade genética, ocorrendo assim, variação somaclonal.

5. CONCLUSÕES

Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp var. NA56-79) tolerantes aos herbicidas ametrin (triazina) e dalapon (ácido alifático clorado) podem ser regeneradas pela técnica da cultura de tecidos. O herbicida dalapon apresenta maior grau de fitotoxicidade, pois mesmo numa baixa concentração (20 ppm) apresenta grande efeito deletério, permitindo apenas a diferenciação de algumas células aclorofiladas em fotossintetizantes e a regeneração de alguns brotos de cana-de-açúcar. Nessa concentração, o herbicida ametrin leva à regeneração de inúmeras plantas inteiras e, somente na dose de 40 ppm apresenta um pequeno efeito inibitório. Assim, as plantas

de cana-de-açúcar mostram-se menos sensíveis à ação do ametrin, e portanto, menos tolerantes ao dalapon.

Na regeneração da planta de cana-de-açúcar, os efeitos dos herbicidas mostram-se diferentes daqueles observados na cultura de células não diferenciadas e nas plantas obtidas e cultivadas pela maneira convencional. Nessas condições o herbicida ametrin apresenta maior efeito deletério sobre a organogênese e crescimento das células em cultura de tecidos.

O dalapon influencia o crescimento das plantas de cana-de-açúcar regeneradas na cultura de tecidos e cultivadas em solução nutritiva. Esse herbicida acarreta uma diminuição do crescimento com a elevação das combinações "tempo de exposição - concentração" de dalapon. A parte aérea (colmo + folhas) das plantas expostas a combinações superiores a 32 horas de exposição - 25 ppm de dalapon apresenta uma consistente diminuição do crescimento. Nessas mesmas condições aparecem efeitos teratogênicos como raquitismo das plantas, folhas deformadas, necrosadas nas extremidades e coloração verde mais escura que a normal. O efeito deletério nas raízes é menos acentuado que o observado na parte aérea das plantas. As raízes começam a apresentar inibição de formação na combinação 128 horas de exposição - 25 ppm de dalapon; acentuando-se em combinações superiores. A ação fitotóxica mais intensa na parte aérea das plantas sugere um acúmulo da concentração do herbicida no interior da folhagem. A causa deve-se à maior taxa de translocação

do herbicida para a folhagem que a taxa de detoxificação do mesmo na planta inteira.

A ação do dalapon observada no crescimento e morfologia das plantas é diferente daquela obtida em alguns trabalhos com cana-de-açúcar, onde o herbicida em doses não letais (menores que 50 ppm) teria efeito indutor da diferenciação e crescimento das plantas.

Combinações superiores a 32 horas de exposição-50 ppm de dalapon promovem aumento no conteúdo em nitrogênio total da planta, e portanto, do valor estimado de proteínas. O efeito sugere ser o sítio primário de ação do dalapon associado à mudança de estrutura das proteínas, aumentando os níveis de aminoácidos livres, amidas e outras estruturas moleculares nitrogenadas menores.

A presença do dalapon na solução nutritiva não altera ou provoca diminuição do teor de açúcares solúveis totais e redutores nas plantas tratadas. O crescente aumento do nível de açúcares redutores pela elevação das combinações "tempo de exposição - concentração" do herbicida não é observado no presente trabalho. Essa observação difere dos clássicos relatos que sugerem a influência do dalapon no metabolismo de carboidratos, bloqueando parcialmente a glicólise e o ciclo de Krebs, elevando assim, o nível dos açúcares simples.

Os resultados obtidos neste trabalho diferem,

em sua maior parte, daqueles obtidos em outros estudos da ação fitotóxica dos mesmos herbicidas em cultura de células da cana-de-açúcar não diferenciadas ou naquelas plantas propagadas e cultivadas de maneira convencional. Isso evidencia a ocorrência de variação somaclonal nas plantas regeneradas na cultura de tecidos. Desta forma, a técnica de regeneração de planta empregada, prestou-se à indução de variabilidade genética, ou à manifestação da variabilidade genética natural já existente na população de indivíduos original.

6. LITERATURA CITADA

ALEXANDER, A.G., 1973. Sugarcane physiology. Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam, pp. 651-654.

ANDERSEN, R.N.; R. BEHRENS e A.J. LINCK, 1962. Effects of Dalapon on some chemical constituents in sugar beets and yellow foxtail. *Weeds*, 10: 4-9.

ASHTON, F.M. e E.G. URIBE, 1962. Effect of atrazine on ^{14}C -sucrose and ^{14}C -serine metabolism. *Weeds*, 10: 203-297.

ASHTON, F.M. e A.S. CRAFTS, 1973. Mode of action of herbicides. Wiley-Interscience Publication, New York, pp. 110-125 e 310-346.

- ASHTON, F.M.; O.T. DE VILLIERS; R.K. GLENN e W.B. DUKE, 1977. Localization of metabolic sites of action of herbicides. *Pest. Biochem. Physiol.*, 7: 122-141.
- BARBA, R.C. e L.G. NICKELL, 1969. Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugarcane, a monocotyledon. *Planta*, 89: 299-302.
- BARBA, R.C.; A.B. ZAMORA; A.K. MALLION e C.K. LINGA, 1977. Sugarcane tissue culture research. *Proc. 16th Cong. ISSCT*, 2: 1843-1864.
- BASSINELLO, A.I.; S. MATSUOKA e A.C. MENDES, 1976. Variedades de cana-de-açúcar para o Estado de São Paulo. *Boletim Técnico n° 3*. PLANALSUCAR, Coordenadoria Regional Sul. Araras-SP., 20 pp.
- BOYEY, D.W.; J.R. BAYER e J.D. DIAZ-COLON, 1974. Phytotoxicity of 2,4-D, Picloram and Dicamba, alone and in mixtures in tissue cultures. *Weed Sci.*, 22: 191-192.
- BOURKE, J.B.; J.S. BUTTS e A.C. FANG, 1964. Effect of various herbicides on glucose metabolism in root tissue of garden peas. II. Plant growth regulators and other herbicides. *Weeds*, 12: 272-279.
- CESTARI, A.N., 1975. Cultura de Tecidos. *Ciência e Cultura*, 27(10): 1056-1069.

- COSSIO, R.P.; N.V. RAMALLO e C.A. GORGIULO, 1977. Tolerance to Dalapon (Sodium 2,2-Dichloropropionate) of different sugarcane varieties cultivated in Argentina. *Proc. Cong. ISSCT*, 16: 1079-1089.
- CRAFTS, A.S., 1957. The chemistry and mode of action of herbicides. X. Trichloroacetic Acid and Dalapon. *Advances in Pest Control Research*, 1: 63-65.
- CROCOMO, O.J.; W.R. SHARP e M.T.V. de CARVALHO, 1979. Controle da morfogênese e desenvolvimento de plantas em cultura de tecido de cana-de-açúcar, resultados experimentais. *Anais do 1º Cong. Nac. STAB*, 1: 241-243.
- CROCOMO, O.J.; N. OCHOA-ALEJO; C.H.R.P. GONÇALVES e O.S. BACCHI, 1981a. Tolerância de variedades de cana-de-açúcar a herbicidas utilizando a técnica da cultura de tecidos. *Anais 2º Cong. Nac. STAB*, 2: 21-40.
- CROCOMO, O.J.; N. OCHOA-ALEJO; C.H.R.P. GONÇALVES e O.S. BACCHI, 1981b. Genetic engineering for the sugarcane plant system. In: CROCOMO, O.J.; F.C.A. TAVARES e D. SODRZEIESKI, Eds. *Genetic Engineering for Biotechnology*. São Paulo PROMOCET, pp. 29-32.
- CROCOMO, O.J.; J.H. FERREIRA; G. BÄNDEL; C.H.R.P. GONÇALVES e M.A. SCHIAVUZZO, 1982. Biochemical and cytological aspects of the development of irradiated sugarcane cells and

tissues. *Proceedings of 5th Congress Plant Tissue and Cell Culture*. Tóquio, Japão, 129-130.

CROCOMO, O.J. e N. OCHOA-ALEJO, 1983. Herbicide tolerance in regenerated plants. *In*: EVANS, O.A.; W.R. SHARP; P.V. AMMI-RATO e Y. YAMADA, Eds. *Handbook of Plant Cell Culture*. U.S. A., MacMillan Publication on Plant Culture, pp. 770-781.

CROCOMO, O.J.; C.H.R.P. GONÇALVES; I.S. MACHADO; J.H. FERREIRA; M.A. SCHIAVUZZO; M.Y. MURAYAMA e N. OCHOA-ALEJO, 1984. O controle da morfogênese *in vitro* e variação somaclonal. "Anais do II Seminário de Biotecnologia Agrícola". Centro de Biotecnologia Agrícola - CEBTEC/FEALQ/USP. Piracicaba-SP, pp. 7-12.

DAVIS, F.S.; A. VILLAREAL; J.R. BAUER e I.S. GOLDSTEIN, 1972. Herbicidal concentrations of Picloram in cell culture and leaf buds. *Weed Sci.*, 20: 185-188.

DE VRIES, M.L., 1963. The effect of simazine on Monterey pine and corn as influenced by lime, bases and aluminium sulfate. *Weeds*, 11: 220-222.

DIAZ-COLON, J.D.; R.W. BOVEY; F.S. DAVIS e J.B. BAUER, 1972. Comparative effects and concentrations of Picloram, 2,4,5-T and Oicamba in tissue culture. *Plant Physiol.*, 27: 60-64.

DUBOIS, M.; K.A. GILLES; J.K. HAMILTON; P.A. REBERS e F. SMITH, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.

EBERT, E. e C.J. VAN ASSCHE, 1969. Influence of atrazine 2-Chloro-4-(Ethylamino)-6-(Isopropylamino)-S-Triazine on auxin metabolism. *Experientia*, 25: 758-759.

ESSER, H.O.; G. DUPUIS; E. EBERT; G.J. MARÇO e C. VOGEL, 1975. S-Triazines. In: KEARNEY, P.C. e D.O. KAUFMAN, Eds. *Herbicides Chemistry, degradation and mode of action*. 2a. New York, Ed. Marcel Dekker, pp. 129-208.

EVANS, D.A.; W.R. SHARP e C.E. FLICK, 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In: THORPE, T.A., Ed. *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture*. London, Academic Press, pp. 45-113.

FAWCETT, C.J.; R.L. WAIN e F. WIGHTMAN, 1956. Plant growth-regulating activities in certain carboxylic acids not possessing a ring structure. *Nature*, 178: 972-974.

FOY, C.L., 1961a. Absorption, distribution and metabolism of 2,2-dichloropropionic acid in relation to phytotoxicity. I. Penetration and translocation of Cl^{36} and Cl^{14} labeled dalapon. *Plant Physiol.*, 36:688-697.

FOY, C.L., 1961b. Absorption, distribution and metabolism of

- 2,2-dichloropropionic acid in relation to phytotoxicity.
II. Distribution and metabolic fate of dalapon in plants.
Plant Physiol., 36: 698-709.
- FRANK, R.; G.J. SIRONIS e G.W. ANDERSON, 1983. Atrazine: the impact of persistent residues in soil on susceptible crop species. *Canadian Journal of Soil Science*, 63(2): 315.
- FRENEY, J.R., 1965. Increased growth and uptake of nutrients by corn plants treated with low levels of simazine. *Austr. J. Agr. Res.*, 16: 257-263.
- FRYER, J.O. e R.J. MAKEPEACE (Eds), 1972. *Weed Control Hand book Recommendations*. 7a. ed. Oxford, Blackwell Sci. Public. Vol. II, 424 pp.
- GOREN, R. e S.P. MONSELISE, 1965. Some physiological effects of triazine on citrus trees. *Plant Physiol. Abstr.*, 40: 15.
- GRESSEL, J., 1978. Factors influencing the selection of herbicide resistant biotypes of weeds. *Reprinted from Outlook on Agriculture*, 9(6): 283.
- GRESSEL, J. e L.A. SEGEL, 1978. The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides. Possible reasons and implications. *J. Theor. Biol.*, 75: 349-371.
- GRESSEL, J.; S. ZILKAH e G. EZRA, 1978. Herbicide action, resistance and screening in cultures vs. plants. *Proc. 4th*

Cong. Plant Tissue Cell Culture. Alberta, pp. 427-436.

GRESSEL, J., 1980. Uses and drawbacks of cell cultures in pesticide research. In: SALA, F.; B. PARISI; R. CELLA. e O. CIFERRI, Eds. *Plant cell cultures: Results and perspectives*. Elsevier, Amsterdam, pp. 379-388.

HEINS, D.J.; M. KRISHNAMURTHI; L.G. NICKELL e A. MARETZKI, 1977. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement. In: REINERT, J. e Y.P.S. BAJAJ, Eds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 3-16.

HILTON, J.L., 1958. Inhibition of enzymatic synthesis of pantothenate by 2,3-dichloroisobutyrate. *Science*, 128:1509-1510.

HILTON, J.L.; L.L. JANSEN e W.A. GENTNER, 1958. Beta - alanine protection of yeast growth against the inhibitory action of several chlorinated aliphatic acid herbicides. *Plant Physiol.*, 33(1): 43-45.

HOAGLAND, D.R. e D.I. ARNON, 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circ.* 347.

INGLE, M. e B.J. ROGERS, 1961. Some physiological effects of 2,2-Dichloropropionic acid. *Weeds*, 9: 264-272.

- JAIN, M.L.; E.B. KURTZ e K.C. HAMILTON, 1966. Effect of Dala pon on glucose utilization in the shoot and root of barley. *Weeds*, 14: 259-262.
- JORDAN, L.S.; T. MURASHIGE; J.O. MANN e B.E. DAY, 1966. Effect of photosynthesis-inhibiting herbicides on non - photosynthetic tobacco callus tissue, *Weeds*, 14: 134-136.
- KING, T.E. e V.H. CHELDELIN, 1948. Pantothenic acid studies. IV. Propionic acid and beta alanine utilization. *Jour.Biol. Chem.*, 174: 273-279.
- LIU, M.C.; Y.J. HUANG e S.C. SHIH, 1972. The *in vitro* production of plants from several tissues of *Saccharum* species. *J. Agric. Assoc. China*, n° 77, pp. 52-58.
- LIU, M.C., 1981. *In vitro* methods applied to sugarcane improvement. In: THORPE, T.A., Ed. *Plant Tissue Culture*. New York, Academic Press, pp. 299-323
- MASHTAKOV, S.M. e P.A. MOSHCHUK, 1967. The effect of sodium trichloroacetate on the content of nitrogenous substances in varieties of lupin resistant and sensitive to herbicides. *Agrokhimiya*, 9: 80-89.
- McWHORTHER, C.G., 1961. Carbohydrate metabolism of johngrass as influenced by seasonal growth and herbicide treatment. *Weeds*, 9: 563-568.

- MILLER, O.F., 1958. Composition of cereal grains and forages. National Academy of Science, National Research Council, Pub. n° 585.
- NADAR, H.M.; M.D. CLEGG e J.W. MARANVILLE, 1975. Promotion of sorghum callus growth by the S-Triazine herbicides. *Plant Physiol.*, 56: 747-751.
- NELSON, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* Baltimore, 153: 375-380.
- NICKELL, L.G., 1967a. Tissue culture and cell culture of sugarcane research. *Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol.*, 12: 887-892.
- NICKELL, L.G., 1967b. Another look at effects of Dalapon. Rept. Exp. Sta. Hawaiian Sugar Plant Assoc., p. 3.
- NICKELL, L.G. e A. MARETZKI, 1970. Sugarcane ripening compounds: comparisons of chemical, biochemical and biological properties. *Hawaiian Plant Record*, 58(5): 71-79.
- OCHOA-ALEJO, N., I.S. MACHADO; E.T. OLIVEIRA e O.J. CROCOMO, 1981. Sugarcane cell and tissue culture systems as fundamental step in the study of the herbicide tolerance factor. In: CROCOMO, O.J.; F.C.A. TAVARES e O. SOORZEIESKI, Eds. *Genetic Engineering for Biotechnology*. São Paulo-Brasil, PROMOCET, pp. 106-107.

OCHOA-ALEJO, N., 1983. Mecanismos de ação do Ametrin: Inibição do crescimento e inter-relação com os processos de transcrição e tradução em suspensões celulares de cana-de-açúcar. São Paulo, Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 85 pp. Tese de Doutorado.

OSWALD, T.H., A.E. SMITH e D.V. PHILLIPS, 1978. Phytotoxicity and detoxification of metribuzin in dark-grown suspension cultures of soybeans. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 8: 73-83.

PRASAD, R. e G.E. BLACKMAN, 1965a. Studies on the physiological action of 2,2-Dichloropropionic acid. II. The effects of light and temperature on the factors responsible for the inhibitions of growth. *J. Exp. Bot.*, 16: 86-106.

PRASAD, R. e G.E. BLACKMAN, 1965b. Studies on the physiological action of 2,2-Dichloropropionic acid. III. Factor affecting the level of accumulation and mode of action. *J. Exp. Bot.*, 16: 545-568.

RAGHAVAN, V., 1977. Totipotency of plant cells. Evidence for the totipotency of male germ cells from anther and pollen culture studies. In: SHARP, W.R.; P.O. LARSEN; E.F. PADDOCK e V. RAGHAVAN, Eds. *Plant Cell and Tissue Culture*. U.S.A., Ohio State University Press, pp. 155-178.

- ROCHECOUSTE, E., 1967. Weed control in sugarcane. Mauritius Sugar Industry Research Institute. Mauritius, cap. VI, pp. 64-65.
- SHANNON, J.C., 1963. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. *Purdue University Res. Bull.*, n° 842, 8 pp.
- SMITH, A.E., 1979. Metabolism of 2,4-DB by white clover (*Trifolium repens*) cell suspensions. *Weed Sci.*, 37: 392-396.
- SWANSON, E.B. e D.T. TOMES, 1980. Plant regeneration from cell cultures of *Lotus corniculatus* and the selection and characterization of 2,4-D tolerant cell lines. *Can. J. Bot.*, 58: 1205-1209.
- WILKINSON, R.E., 1962. Growth Inhibitions by 2,2-Dichloropropionic acid. *Weeds*, 10(4): 275-281.
- ZILKAH, S.; P.F. BOGION e J. GRESSEL, 1977. Cell culture vs. whole plants for measuring phytotoxicity. II. Correlations between phytotoxicity in seedlings and calli. *Plant Cell Physiol.*, 18: 657-670.
- ZILKAH, S. e J. GRESSEL, 1977 a. Cell culture vs. whole plants for measuring phytotoxicity. I. The establishment and growth of callus and suspension cultures; definition of

factors affecting toxicity on calli. *Plant Cell Physiol.*,
18: 641-655.

ZILKAH, S. e J. GRESSEL, 1977b. Cell Cultures vs. whole plants
for measuring phytotoxicity. III. Correlations between phy
totoxicities in cell suspension cultures, calli and see
dlings. *Plant Cell Physiol.*, 18: 815-820.

7. APÊNDICE

TABELA 3 - Médias de comprimento (cm) da parte aérea (colmo+folhas) de cana-de-açú
 car, influenciado pela exposição da planta a diferentes concentrações
 (ppm) de dalapon em diferentes períodos (horas) de tratamento.

SEMANAS DE TRATAMENTO	DALAPON (ppm)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (horas)					TESTE F		
		0	2	8	32	128		512	
1	0	79,67	69,92	86,67	74,67	77,17	71,50	2,18
	25	71,83	84,50	63,92	78,75	81,83	81,75		
	50	65,92	71,00	79,92	79,08	75,75	82,50		
	75	77,90	56,83	76,92	67,00	58,00	84,25		
2	0	118,42	108,17	118,25	107,33	105,08	106,67	5,41*
	25	107,58	117,75	97,50	93,16	94,33	94,00		
	50	103,25	104,50	109,17	93,08	79,50	84,92		
	75	114,50	91,25	103,08	75,92	61,75	88,58		
3	0	155,25	147,58	162,00	147,25	152,08	150,25	20,06*
	25	153,08	157,17	133,67	97,08	91,67	94,00		
	50	136,33	143,25	144,83	94,83	78,83	84,92		
	75	151,80	126,42	132,50	86,83	61,17	88,58		
4	0	172,75	164,92	183,17	164,58	176,17	188,42	32,81*
	25	166,75	175,33	149,92	113,42	95,50	95,00		
	50	155,42	157,33	172,42	92,83	78,67	84,00		
	75	165,70	145,00	155,50	93,50	59,58	87,58		
5	0	204,83	196,08	212,08	197,58	209,92	207,83	39,74*
	25	119,25	210,17	186,50	164,00	108,75	91,83		
	50	182,25	195,16	209,33	119,92	79,25	83,33		
	75	185,80	181,00	200,67	112,50	60,58	87,00		

Os grupos pertencentes à combinação 0 horas de exposição - 0 ppm de dalapon não foram considerados na análise perfil para verificar efeito de grupo dentro da semana de tratamento.

* Significativos ao nível de 5%.

TABELA 4 - Médias de comprimento (cm) da raiz de cana-de-açúcar, influenciado pela exposição da planta a diferentes concentrações (ppm) de dalapon em diferentes períodos (horas) de tratamento.

SEMANAS DE TRATAMENTO	DALAPON (ppm)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (horas)						TESTE F
		0	2	8	32	128	512	
1	0	16,83	13,83	18,00	15,00	20,17	17,16	* 1,73
	25	11,17	15,17	12,50	15,33	15,33	15,17	
	50	13,33	14,00	13,83	15,00	15,33	14,33	
	75	13,80	11,67	15,33	14,33	14,33	15,00	
2	0	24,00	19,83	19,50	21,33	22,17	21,50	* 2,84
	25	19,33	20,00	17,33	21,17	15,50	19,00	
	50	20,33	20,50	17,33	18,50	15,17	14,33	
	75	20,80	18,17	19,83	19,33	15,17	16,50	
3	0	27,33	25,50	23,50	23,17	24,00	22,17	* 1,11
	25	20,67	24,83	22,50	24,00	21,17	26,17	
	50	27,00	22,83	22,00	22,00	21,33	21,83	
	75	25,00	21,00	22,67	24,33	21,00	21,00	
4	0	26,83	27,25	24,25	24,50	24,08	22,83	* 2,95
	25	23,25	25,00	23,25	22,00	25,33	26,67	
	50	26,17	25,58	23,33	22,92	22,00	22,75	
	75	23,60	22,00	24,42	24,75	19,67	21,25	
5	0	25,58	26,25	24,42	26,25	24,83	24,17	* 2,11
	25	24,58	24,33	24,17	24,75	26,67	27,67	
	50	26,33	26,75	23,00	24,25	23,50	25,33	
	75	24,90	22,75	26,00	25,17	22,42	23,50	

Os grupos pertencentes à combinação 0 horas de exposição - 0 ppm de dalapon não foram considerados na análise perfil para verificar efeito de grupo dentro da semana de tratamento.

* Significativo ao nível de 5%.

TABELA 5 - Médias da produção de MATÉRIA FRESCA (grama/planta) da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (horas)	DOSES DE DALAPON (ppm)			
	0	25	50	75
0	134,28 b	113,20 ab	122,88 ab	135,02 a
2	118,40 b	147,19 a	133,32 ab	98,32 ab
8	153,26 b	113,65 ab	147,78 a	143,28 a
32	133,86 b	97,06 ab	79,91 b	42,36 bc
128	131,60 b	64,63 bc	15,57 c	9,42 c
512	231,32 a	37,79 c	10,39 c	14,71 c

ANÁLISE DA VARIÂNCIA (teste F)

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
DOSES (DO)	3	124863,57	41621,18	50,44*
RESÍDUO (a)	20	16501,69	825,08	
PARCELAS	23	141365,26		
TEMPOS (TE)	5	136083,86	27216,77	23,48*
INTERAÇÃO DO x TE	15	175886,23	11725,74	10,11*
RESÍDUO (b)	100	115902,03	1159,02	

COEF. VAR. PARCELA = 28,38%

COEF. VAR. SUBPARCELA = 33,64%

Dentro das doses, as médias seguidas de letras iguais não diferem, estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade.

* Significância ao nível de 5%.

TABELA 6 - Médias da produção de MATÉRIA FRESCA (grama/planta) da raiz de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (horas)	DOSES DE DALAPON (ppm)			
	0	25	50	75
0	30,92 b	23,32 b	31,26 ab	39,38 a
2	25,36 b	35,70 ab	38,54 a	22,96 bc
8	38,66 b	23,96 b	28,44 ab	35,56 ab
32	33,60 b	23,48 b	17,65 b	17,40 bc
128	37,98 b	27,28 ab	22,64 ab	13,92 c
512	56,00 a	40,42 a	21,57 b	27,21 abc

ANÁLISE DA VARIÂNCIA (teste F)

CAUSA DA VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
DOSES (DO)	3	2920,51	973,50	12,95 *
RESÍDUO (a)	20	1502,78	75,14	
PARCELAS	23	4423,29		
TEMPOS (TE)	5	2655,34	531,07	5,85 *
INTERAÇÃO DO x TE	15	6678,71	445,25	4,90 *
RESÍDUO (b)	100	9073,57	90,74	

COEF. VAR. PARCELA = 29,29%

COEF. VAR. SUBPARCELA = 32,19%

Dentro das doses, as médias seguidas de letras iguais não diferem, estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade.

* Significância ao nível de 5%.

TABELA 7 - Médias da produção de MATÉRIA SECA (grama/planta) da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (horas)	DOSES DE DALAPON (ppm)			
	0	25	50	75
0	18,88 ab	16,05 ab	17,06 a	18,50 a
2	15,54 b	21,83 a	17,94 a	12,95 ab
8	21,58 ab	14,58 ab	20,63 a	20,37 a
32	18,61 ab	13,04 ab	10,03 ab	5,56 b
128	26,84 ab	7,55 b	2,59 b	1,65 b
512	29,94 a	7,37 b	2,59 b	3,20 b

ANÁLISE DA VARIÂNCIA (teste F)

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
DOSES (DO)	3	2884,57	961,52	20,91*
RESÍDUO (a)	20	919,31	45,96	
PARCELAS	23	3803,89		
TEMPOS (TE)	5	2010,08	402,02	8,83*
INTERAÇÃO DO x TE	15	3625,11	241,67	5,30*
RESÍDUO (b)	100	4552,24	45,52	

COEF. VAR. PARCELA = 47,18%

COEF. VAR. SUBPARCELA = 46,95%

Dentro das doses, as médias seguidas de letras iguais não diferem, estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade.

* Significância ao nível de 5%.

TABELA 8 - Médias da produção de MATÉRIA SECA (grama/planta) da raiz de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (horas)	DOSES DE DALAPDN (ppm)			
	0	25	50	75
0	3,98 b	2,86 a	3,38 a	3,50 a
2	2,68 b	3,25 a	3,38 a	1,84 bc
8	3,27 b	2,60 a	2,86 a	2,97 ab
32	3,20 b	2,19 a	2,05 ab	1,95 bc
128	3,36 b	2,66 a	1,33 b	1,33 bc
512	5,50 a	3,72 a	2,12 ab	2,75 abc

ANÁLISE DA VARIÂNCIA (teste F)

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
DOSES (DD)	3	35,36	11,78	18,42*
RESÍDUO (a)	20	12,79	0,64	
PARCELAS	23	48,15		
TEMPOS (TE)	5	36,27	7,25	9,01*
INTERAÇÃO DO x TE	15	42,20	2,81	3,49*
RESÍDUO (b)	100	80,48	0,80	

COEF. VAR. PARCELA = 27,92%

COEF. VAR. SUBPARCELA = 31,32%

Dentro das doses, as médias seguidas de letras iguais não diferem, estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade.

* Significância ao nível de 5%.

TABELA 9 - Média dos teores de PROTEÍNAS (mg/100 mg m.s.) na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (horas)	DOSES DE DALAPDN (ppm)			
	0	25	50	75
0	11,63 ab	11,94 c	12,00 cd	11,73 d
2	11,54 ab	11,08 c	10,65 d	11,73 d
8	10,55 bc	11,08 c	11,54 cd	12,02 d
32	12,24 a	11,90 c	12,57 c	14,11 c
128	12,21 a	14,13 b	17,79 b	19,28 b
512	9,47 c	17,31 a	19,47 a	21,30 a

ANÁLISE DA VARIÂNCIA (teste F)

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
DOSES (DO)	3	185,58	61,86	189,84*
RESÍDUO (a)	12	3,91	0,32	
PARCELAS	15	189,49		
TEMPOS (TE)	5	481,79	96,36	192,41*
INTERAÇÃO DO x TE	15	285,68	19,04	38,03*
RESÍDUO (b)	60	30,05	0,50	

COEF. VAR. PARCELA = 4,29%

COEF. VAR. SUBPARCELA = 5,32%

Dentro das doses, as médias seguidas de letras iguais não diferem, estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade.

* Significância ao nível de 5%.

TABELA 10 - Média dos teores de PROTEÍNAS (mg/100 mg m.s.) na raiz de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (horas)	DOSES DE DALAPON (ppm)			
	0	25	50	75
0	13,06 a	12,32 bc	11,78 cd	11,96 c
2	11,50 a	10,72 c	10,60 d	11,82 c
8	11,10 a	13,06 b	11,17 cd	10,75 c
32	10,63 a	11,12 bc	12,78 c	15,67 b
128	11,94 a	13,06 b	18,14 b	23,11 a
512	11,22 a	17,88 a	21,48 a	22,27 a

ANÁLISE DA VARIÂNCIA (teste F)

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
DOSES (DO)	3	248,20	82,73	80,23*
RESÍDUO (a)	12	12,37	1,03	
PARCELAS	15	260,58		
TEMPOS (TE)	5	689,67	137,93	134,28*
INTERAÇÃO DO x TE	15	455,62	30,37	29,57*
RESÍDUO (b)	60	61,63	1,03	

COEF. VAR. PARCELA = 7,40%

COEF. VAR. SUBPARCELA = 7,39%

Dentro das doses, as médias seguidas de letras iguais não diferem, estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade.

* Significância ao nível de 5%.

TABELA 11 - Conteúdo médio de AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS (mg/100 mg m.s.) da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (horas)	DOSES DE DALAPON (ppm)			
	0	25	50	75
0	8,69 a	6,98 a	8,62 a	6,55 b
2	7,96 a	4,45 a	14,48 a	7,49 b
8	8,68 a	7,60 a	10,50 a	17,02 a
32	9,41 a	8,00 a	6,52 a	6,44 b
128	8,32 a	5,54 a	5,90 a	6,52 b
512	11,62 a	7,71 a	8,08 a	10,78 ab

ANÁLISE DA VARIÂNCIA (teste F)

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
DOSES (DO)	3	50,78	16,93	18,68*
RESÍDUO (a)	4	3,62	0,91	
PARCELAS	7	54,41		
TEMPOS (TE)	5	98,22	19,64	4,48*
INTERAÇÃO DO x TE	15	213,90	14,26	3,25*
RESÍDUO (b)	20	87,68	4,38	

COEF. VAR. PARCELA = 11,21%

COEF. VAR. SUBPARCELA = 24,61%

Dentro das doses, as médias seguidas de letras iguais não diferem, estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade.

* Significância ao nível de 5%.

TABELA 12 - Conteúdo médio de AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS (mg/100 mg m.s.) da raiz de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (horas)	DOSES DE DALAPON (ppm)			
	0	25	50	75
0	6,15 ab	3,91 a	2,68 c	2,54 b
2	2,46 c	3,76 a	5,36 abc	3,70 b
8	3,12 bc	4,34 a	2,93 bc	2,46 b
32	3,06 bc	2,10 a	3,86 bc	3,84 b
128	5,94 ab	4,32 a	6,01 ab	4,56 b
512	8,18 a	7,46 a	7,24 a	7,82 a

ANÁLISE DA VARIÂNCIA (teste F)

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
DOSES (DO)	3	3,46	1,15	
RESÍDUO (a)	4	9,55	2,39	
PARCELAS	7	13,02		
TEMPOS (TE)	5	118,44	23,69	22,44*
INTERAÇÃO DO x TE	15	35,48	2,36	2,24*
RESÍDUO (b)	20	21,10	1,06	

COEF. VAR. PARCELA = 34,41%

COEF. VAR. SUBPARCELA = 22,87%

Dentro das doses, as médias seguidas de letras iguais não diferem, estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade.

* Significância ao nível de 5%.

TABELA 13 - Média dos teores de AÇÚCARES REDUTORES (mg/100mg m.s.) na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e respectivos testes estatísticos.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (horas)	DOSES DE DALAPON (ppm)			
	0	25	50	75
0	2,26 a	2,26 a	3,96 a	4,16 a
2	4,89 a	2,38 a	3,32 a	1,90 a
8	3,35 a	3,03 a	4,89 a	3,96 a
32	2,95 a	2,91 a	1,78 a	3,19 a
128	2,22 a	1,86 a	1,86 a	2,99 a
512	3,48 a	2,54 a	2,54 a	2,20 a

ANÁLISE DA VARIÂNCIA (teste F)

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
DOSES (DO)	3	3,44	1,15	6,01
RESÍDUO (a)	4	0,76	1,19	
PARCELAS	7	4,20		
TEMPOS (TE)	5	11,61	2,32	4,50*
INTERAÇÃO DO x TE	15	23,36	1,56	3,02*
RESÍDUO (b)	20	10,30	0,51	

COEF. VAR. PARCELA = 14,78%

COEF. VAR. SUBPARCELA = 24,30%

Dentro das doses, as médias seguidas de letras iguais não diferem, estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade.

* Significância ao nível de 5%.