



**DANIELA AUGUSTINHO**

**TOLERÂNCIA DE CULTIVARES DE CANA-DE-  
AÇÚCAR AO GLIFOSATO POR MEIO DO  
ACÚMULO DO ACIDO CHIQUÍMICO  
DETERMINADO POR ANÁLISES  
COLORIMÉTRICAS**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**DANIELA AUGUSTINHO**

**TOLERÂNCIA DE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR AO  
GLIFOSATO POR MEIO DO ACÚMULO DO ACIDO CHIQUÍMICO  
DETERMINADO POR ANÁLISES COLORIMÉTRICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – Curso de Mestrado Profissional, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. João Bosco dos Santos

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Augustinho, Daniela.

Tolerância de cultivares de cana-de-açúcar ao glifosato por meio do acúmulo do ácido chiquímico determinado por análises colorimétricas / Daniela Augustinho. – Lavras : UFLA, 2015.  
56 p. : il.

Dissertação(mestrado profissional)–Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: João Bosco dos Santos.

Bibliografia.

1. Glifosato. 2. Cana-de-açúcar. 3. Ácido chiquímico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**DANIELA AUGUSTINHO**

**TOLERÂNCIA DE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR AO  
GLIFOSATO POR MEIO DO ACÚMULO DO ACIDO CHIQUÍMICO  
DETERMINADO POR ANÁLISES COLORIMÉTRICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – Curso de Mestrado Profissional, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2014.

Dr. José Airton Rodrigues Nunes      UFLA  
Dra. Silvia Balbão Filippi Oliveira      USP - ESALQ

Dr. João Bosco dos Santos  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2014**

## RESUMO

Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de avaliar a tolerância de cultivares de cana-de-açúcar ao glifosato, por meio de um método colorimétrico. Foram avaliadas cinco cultivares de cana, sendo uma transgênica para tolerância ao glifosato, em oito concentrações de glifosato (0, 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 512 $\mu$ M). Cada parcela correspondeu a um poço de uma placa com solução de glifosato, onde colocaram-se 3 discos foliares de 6mm de diâmetro, que foram incubados por 24 horas. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 2 repetições. O teor de ácido chiquímico de cada tratamento foi medido por espectrofotômetro. O método colorimétrico foi eficiente e rápido para discriminar as cultivares quanto a sensibilidade ao glifosato e também para distinguir o efeito das diferentes doses de herbicida.

Palavras-chave: Glifosato. Ácido chiquímico. EPSPS. Cana-de-açúcar.

## **ABSTRACT**

There is a lack of information regarding herbicide tolerance of commercial sugarcane cultivars which are launched by breeding programs. These information can provide great savings for producers as reduction of environmental impacts and the amount of herbicide utilization. There are morphological, physiological and biochemical proprieties differences among sugarcane cultivars and by reason of they have different levels of herbicide tolerance. It is known that the biochemical mode of action of glyphosate in a plant metabolic pathway is called mechanism of shikimic acid and the effective methodology for rapid and specific detection and quantification of shikimic acid in plant tissue has many advantages as it is a colorimetric test which can be clearly observed and qualitatively assessed. Therefore, the results of this study show that this assay can be used to determine sensitivity and tolerance of plants to glyphosate.

Keywords: Sugarcane. Glyphosate. Shikimic acid.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Colmo característico da cultivar Co62197, com detalhe para o internódio e nó. Note a alternância da posição das gemas entre internódios.....	17
Figura 2	Ilustração representando os tipos de nós, internódios e gemas observados em <i>Saccharum</i> spp., classificados de acordo com a forma.....	18
Figura 3	Folha característica de cultivar Co86071, com detalhe para bainha, colar (composto de cotovelo, lígula e aurícula) e lâmina foliar.....	19
Figura 4	Ilustração representando a formação de uma touceira de cana-de-açúcar com perfilhos formados, a partir de brotos de gemas presentes no rizoma.....	20
Figura 5	Fórmula estrutural do Glifosato.....	25
Figura 6	As plantas tratadas com glifosato apresentam um menor crescimento quando comparadas às plantas sem o tratamento com herbicida e morrem em poucos dias por falta de alguns nutrientes essenciais.....	26
Figura 7	Via do ácido chiquímico: síntese de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano.....	29
Figura 8	(A), (B), (C) e (D) são vias metabólicas para a obtenção de ácidoindolacético.....	30
Figura 9	Reação catalizada pela enzima EPSP sintetase com a qual o glifosato compete pelo substrato natural PEP.....	31
Figura 10	Reação de conversão de ácido chiquímico em tetrazólio reduzido.....	33

Figura 11	Média da concentração de ácido chiquímico nas cultivares de cana-de-açúcar pela análise conjunta dos dois experimentos. Desvio padrão = 0,023; CV = 25,1 .....	37
Figura 12	Média da concentração de ácido chiquímico em cana-de-açúcar em função das doses de glifosato na análise conjunta dos dois experimentos. Desvio padrão = 0,023; CV = 25,1 .....	38
Figura 13	Análise de regressão para a concentração de ácido chiquímico em função de doses crescentes de glifosato na cultivar A de cana-de-açúcar, indicando significância a 1% para relação quadrática .....	40
Figura 14	Análise de regressão para a concentração de ácido chiquímico em função de doses crescentes de glifosato na cultivar B de cana-de-açúcar, indicando significância a 1% para relação quadrática .....	41
Figura 15	Análise de regressão para a concentração de ácido chiquímico em função de doses crescentes de glifosato na cultivar C de cana-de-açúcar, indicando significância a 1% para relação quadrática .....	41
Figura 16	Análise de regressão para a concentração de ácido chiquímico em função de doses crescentes de glifosato na cultivar D de cana-de-açúcar, indicando significância a 1% para relação quadrática .....	42
Figura 17	Análise de regressão para a concentração de ácido chiquímico em função de doses crescentes de glifosato na cultivar E de cana-de-açúcar, indicando significância a 1% para relação quadrática .....	42



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise de variância conjunta da concentração de ácido chiquímico em função de diferentes cultivares de cana-de-açúcar e de doses crescentes de glifosato .....	36
Tabela 2	Médias da concentração de ácido chiquímico em cultivares de cana-de-açúcar tratadas com doses crescentes de glifosato. Análise conjunta dos experimentos.....	39

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>1.1</b>	<b>O uso do glifosato na cultura da cana - de - açúcar</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Aspectos econômicos da cultura de cana-de-açúcar no Brasil e demanda mundial de cana-de-açúcar</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Características botânicas de cana-de-açúcar</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Melhoramento genético de cana-de-açúcar</b> .....	21
<b>2.4</b>	<b>Controle químico de plantas daninhas na cultura de cana-de-açúcar</b> .....	22
<b>2.5</b>	<b>O Glifosato</b> .....	24
<b>2.6</b>	<b>A Enzima EPSP sintetase</b> .....	29
<b>2.7</b>	<b>Quantificação de ácido chiquímico, por meio da utilização da enzima chiquimato desidrogenase</b> .....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	34
<b>3.1</b>	<b>Ensaio bioquímico para a quantificação de ácido chiquímico</b> .....	34
<b>3.2</b>	<b>Análise estatística</b> .....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

Desde que foi introduzida pelos portugueses no século XVI, a cana-de-açúcar possuiu um papel expressivo para a economia brasileira e está entre as principais culturas no Brasil. O Programa Nacional do Alcool (Proalcool), lançado em 1975 pelo governo federal, teve como objetivo reduzir a dependência do país em relação ao petróleo e, desde então, iniciou-se um processo de transformação do agronegócio da cana, o que resultou em grandes investimentos em melhorias tecnológicas. O agronegócio da cana vem tendo forte expansão na última década, em razão da demanda por fontes de energia menos agressivas ao meio ambiente, assim, o setor passa por uma nova fase de grandes investimentos diante da expectativa de aumento no consumo mundial de etanol como fonte de combustível alternativo ao petróleo.

O Brasil é o maior produtor e exportador de açúcar, responsável por, aproximadamente, 20% de toda produção mundial. Dois terços dessa produção são destinados à exportação o que faz com que o Brasil seja responsável por 37% do mercado internacional de açúcar (BRASIL, 2010).

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011), a área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2013/14 está estimada em 8.799.150 hectares, distribuídas em todos estados produtores. Isso equivale a um acréscimo de 3,7% em relação à safra 2012/13.

Da mesma forma, o Brasil se destaca na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar. A produção de etanol total fechou em 23,64 bilhões de litros na safra 2012/13 e a estimativa para 2013/14 é 27,17 bilhões de litros, um acréscimo de 3,53 bilhões de litros, ou seja, alta de 14,94% (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011). Mais da metade da gasolina

consumida é substituída pelo etanol. Vale lembrar também que o uso do bagaço da cana, para gerar eletricidade, pode alcançar até 2020 um coeficiente de produção comparável a usina de Itaipu (SOUZA et al., 2010).

Ficando atrás apenas do milho e da soja, a cultura de cana é de grande importância econômica para o agronegócio brasileiro, estando entre as três culturas mais importantes do país. A sacarose de cana-de-açúcar destina-se, fundamentalmente, à produção de açúcar e etanol. O bagaço proveniente do processamento industrial é utilizado na geração de vapor, para movimentar a usina e a energia elétrica excedente é distribuída ao sistema elétrico nacional. Além disso, o bagaço de cana-de-açúcar ainda pode ser aproveitado para a produção de ração animal.

### **1.1 O uso do glifosato na cultura da cana- de- açúcar**

O glifosato é o herbicida mais usado para erradicação química de soqueiras de cana por ser não seletivo e eficaz para um amplo espectro de plantas. É um herbicida de baixo custo e não possui efeito residual no solo, permitindo cortes sucessivos, que é uma prática comum entre produtores de cana (GALLI, 2009; SILVA et al., 2006).

As cultivares de cana-de-açúcar possuem diferenças morfológicas, fisiológicas e em suas propriedades bioquímicas e, por isso, possuem um comportamento diferente com relação à tolerância a diversos herbicidas (ARANTES et al., 2013; GALON; CARLIN; CAPUTO, 2010). A dose recomendada de glifosato para erradicação é de 1.440 a 2.880 g a.e. ha<sup>-1</sup> (LORENZI, 1988). De acordo com a bula do produto original, observa-se apenas indicação da dose de 2880g/há, onde a aplicação deve ser feita quando a média das folhas estiver entre 0,6m a 1,2 m de altura, medida a partir do chão ou

quando a última lígula visível estiver a 40 cm do solo. É fundamental que a aplicação seja feita antes da formação de colmos na soqueira.

A via do ácido chiquímico desempenha um papel importante no metabolismo da planta, onde 35% do peso total da planta em massa é proveniente dessa via metabólica. Além de que, 20% do total de carbono fixado na fotossíntese é usado na via do ácido chiquímico (KRUSE et al., 2000). Inibir a via do ácido chiquímico é um método alternativo para interferir no crescimento de plantas que tem sido utilizado para desenvolver herbicidas de baixo impacto ambiental, tal como glifosato (GRUYS; SIKORSKI, 1999).

Plantas sensíveis ao glifosato acumulam altas concentrações de ácido chiquímico após tratamento com glifosato. A detecção do ácido chiquímico tem demonstrado ser um marcador muito útil para verificar o nível de sensibilidade ou tolerância de plantas ao glifosato (MATALLO et al., 2009).

Existe, no Brasil, uma falta de informação sobre a tolerância ao herbicida para as cultivares comerciais de cana-de-açúcar lançadas pelos programas de melhoramento. Essas informações a respeito da tolerância ao glifosato podem trazer grande economia para os produtores, diminuindo os impactos ambientais e reduzindo a quantidade de herbicida aplicado (CABRAL, 2012).

Desta forma, avaliar de forma rápida e eficaz o acúmulo de ácido chiquímico em cultivares de cana-de-açúcar pode ser uma forma interessante, tanto para recomendações de manejo para o agricultor quanto para os programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a tolerância de cultivares de cana-de-açúcar ao glifosato, por meio do acúmulo de ácido chiquímico. Foram avaliadas as concentrações de ácido chiquímico acumuladas, via método colorimétrico, após exposição a diferentes concentrações de glifosato, de 5 cultivares comerciais de cana-de-açúcar, incluindo um evento de

cana-de-açúcar, ainda em fase de desenvolvimento, transformado com uma construção gênica que confere tolerância ao glifosato.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos econômicos da cultura de cana-de-açúcar no Brasil e demanda mundial de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é utilizada para a produção de açúcar e seu bagaço na geração de vapor para movimentar a usina e gerar energia elétrica para o sistema elétrico nacional (cogeração) e também para produção de ração animal. A cana também pode ser utilizada como matéria-prima para produção de rapadura, melado, aguardente, além de plástico (polietileno), biodiesel, Farneseno, etc (BORBA; BAZZO, 2009).

Os principais produtores de cana-de-açúcar são: Brasil, Índia, China, Tailândia e Paquistão (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION, 2014). O Brasil é o primeiro no ranking mundial. A expansão do setor sucroalcooleiro trouxe um avanço na economia brasileira e, desde 2005, 117 novas unidades produtoras de etanol, açúcar e bioeletricidade entraram em operação, o que alavancou os outros setores da economia como construção civil, siderúrgica, fabricação de máquinas e tratores, fertilizantes, etc (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA, 2012).

Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (2013), 87% dos veículos leves vendidos no Brasil têm motor *flexfuel*, o que significa um aumento de 80%, desde 2005 até 2012. Atualmente, a frota de veículos *flex* está maior do que 12 milhões de unidades.

A estimativa é que, em 2030, a cana-de-açúcar e seus derivados sejam a segunda fonte de energia mais importante de Matriz Energética Brasileira (BRASIL, 2007).

A busca mundial por etanol como combustível e energia renovável tem se tornado cada vez mais necessária e de grande interesse internacional. Desde 1987, ano em que o governo francês aprovou uma lei que permitia a mistura de 3 a 15% de oxigenados orgânicos ao petróleo, países membros da União Europeia têm feito uso do etanol, e, em 1992, começou a beneficiar quem utilizasse etanol. Em 1995, a Espanha também passou a utilizar etanol na mistura de combustíveis (LANNEREE; MONIER, 2000).

Segundo Figueira e Burnquist (2008), o setor sucroalcooleiro do Brasil mostrou-se com grande potencial de crescimento pelo etanol hidratado. Com a implantação dos programas de bioetanol em diversos países, acredita-se num aumento no comércio exterior de etanol combustível, isso em um panorama de mercado brasileiro. O Japão, por exemplo, não terá condições de produzir etanol suficiente, a partir de arroz, para suprir sua demanda energética. Sendo assim, o Brasil poderá ser o principal fornecedor desse combustível nos próximos anos. O Conselho Europeu sugeriu a utilização de combustíveis derivados de fontes agrícolas (bicompostíveis), sendo essa a tecnologia com maior potencial em curto e médio prazo. Entretanto, apesar do interesse e potencial uso do etanol, como substituto renovável, os países têm retardado as políticas de adoção de etanol, excetuando alguns países do norte da Europa, como a Suécia e os EUA.

Segundo o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (2013), um estudo realizado em 2006 mostra que o consumo mundial de etanol combustível passará de 26 bilhões de litros para 205 bilhões em 2025. Dentre a demanda mundial, 40 países já misturam o etanol à gasolina com o intuito de reduzir a emissão de gases que provocam efeito estufa e também a dependência do petróleo importado.

Ainda, segundo o IPEA (INSTITUTO DE PESQUISA ECONIMICA APLICADA, 2013), combustíveis que utilizam etanol proveniente de cana-de-açúcar são cerca de 50% menos poluentes que a gasolina. A mistura de 10% de



etanol à gasolina diminui em até 19% a emissão de gases relacionados ao efeito estufa. Além disso, em comparação com o milho, há maior eficiência no balanço energético na geração de energia renovável com a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar do que a partir de milho.

Além disso, é possível o uso de etanol de celulose com as possibilidades de hidrólise de bagaço de cana que podem aumentar, ainda mais, a produtividade industrial da cultura da cana-de-açúcar (DANTE; CRISTOFOLETTI; GERHARDT, 2010). Assim, investimentos em tecnologia de campo e avanços na área genômica e biotecnologia para garantir reduções na perda de produtividade de cana e aumentar a produtividade se tornam cada vez mais essenciais, uma vez que a demanda dessa *commodity* cresce significativamente.

## 2.2 Características botânicas de cana-de-açúcar

O botânico Dillewijn, com o livro “Botany of Sugarcane” publicado em 1952 e desenvolvido durante a fase de revisão taxonômica no século XX é o principal trabalho com estudos dos caracteres morfológicos da cana-de-açúcar (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008).

As espécies de cana-de-açúcar, apesar de serem perenes em sua forma natural, são semiperenes em sua forma cultivada, pois exigem novos plantios após algumas colheitas, uma vez que o número de colheitas depende do local e do manejo utilizado para o cultivo. Geralmente, as espécies e cultivares de *Saccharum* possuem porte grande e sempre se desenvolvem na forma de touceiras. A parte aérea da planta é formada por colmos, folhas e inflorescências, com exceção de algumas plantas de *S.spontaneum*. A parte subterrânea é formada por raízes e rizomas.

Os colmos são cilíndricos e formados por consecuintes “entrenós” (ouinternódios) ligados entre si pelos “nós” (ounódios). Cada nó possui uma

gema axilar que se dispõe de maneira alternada entre cada internódio. Essas gemas axilares são utilizadas no cultivo extensivo para propagação das plantas e, por isso, a cana-de-açúcar é, repetidamente, descrita como uma cultura de propagação vegetativa (Figura 1).



Figura 1 Colmo característico da cultivar Co62197, com detalhe para o internódio e nó. Note a alternância da posição das gemas entre internódios

Fonte: Subramanian (1987).

A cana-de-açúcar é propagada por semente apenas na natureza ou para fins de melhoramento genético. Entre nós, nós e gemas, que compõem um colmo, possuem diversos tamanhos e formas, variando entre diferentes espécies e cultivares (Figura 2).

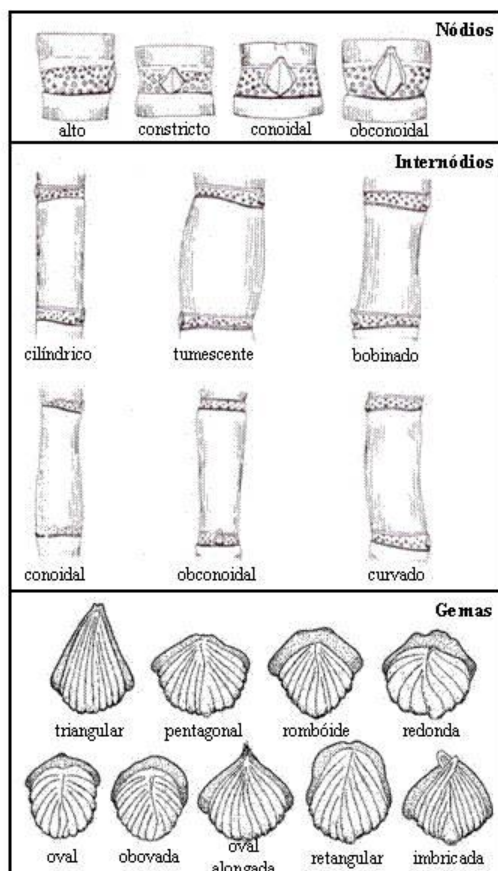


Figura 2 Ilustração representando os tipos de nós, internódios e gemas observados em *Saccharum* spp., classificados de acordo com a forma  
 Fonte: Artschwager e Brandes (1958 apud JAMES, 2004).

As folhas estão fixadas à base dos nós e são divididas em duas partes: lâmina foliar e bainha. A bainha é a uma região da folha que envolve o colmo e liga a lâmina foliar ao nó. A lâmina foliar é a região sustentada pela nervura central que se projeta, a partir da bainha, na forma alongada e plana. A lâmina foliar pode manter-se ereta até o topo, dobrada ou curva, próxima ao topo ou curvada em sua altura média. A bainha pode apresentar coloração diferente da lâmina foliar, além da presença de pelos denominados de joçal e cera. O ponto

de ligação entre a bainha e a lâmina foliar é chamado de colar. O colar é dividido em três partes: cotovelo, lígula e aurícula. Na Figura 5, apresenta-se, em detalhe: a bainha, colar e lâmina foliar.

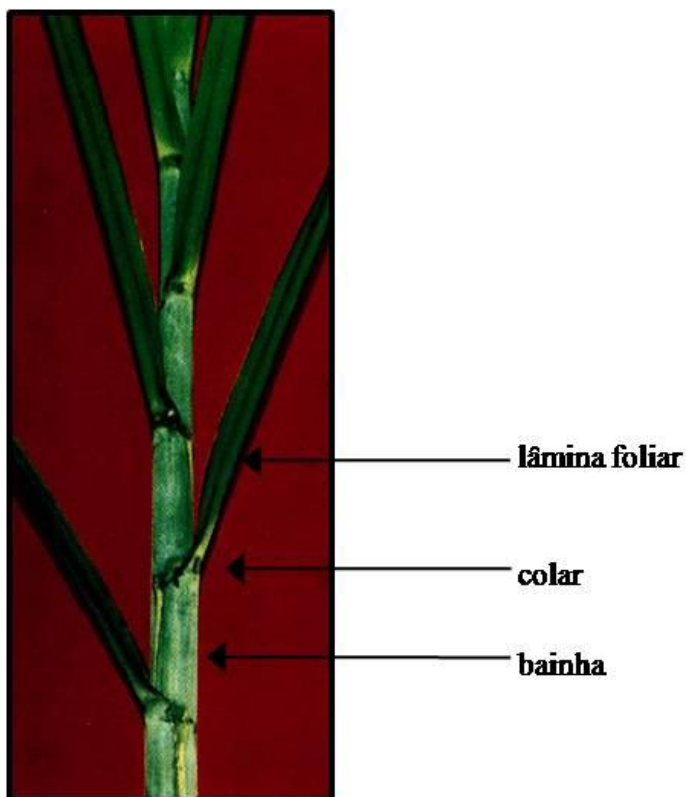


Figura 3 Folha característica de cultivar Co86071, com detalhe para bainha, colar (composto de cotovelo, lígula e aurícula) e lâmina foliar

Fonte: Ferrari (2010).

As raízes da cana-de-açúcar são fasciculadas e podem ser de dois tipos: adventícias, para absorção de água no estágio inicial de brotação das gemas, e permanentes, para absorção de água das camadas mais profundas, sobretudo no período da seca e sustentação da touceira já formada (MONGELARD, 1968; THOMPSON, 1976).

Os rizomas são caules subterrâneos, espessos, ricos em reservas e que possuem crescimento horizontal. Como nos colmos, os rizomas são constituídos de entrenós, nós e gemas aptas a brotar e formar novos colmos. Os colmos derivados das gemas do rizoma são chamados de perfilhos e cada perfilho comporta-se de modo independente, porém todos são ligados entre si e constituem a touceira. Os primeiros brotos formarão colmos (perfilho primário), com gemas que formarão novos colmos (perfilho secundário). As gemas desse novo colmo formarão novos colmos (perfilho terciário), assim, sucessivamente e constituindo a touceira (Figura 4). Na espécie *S.spontaneum*, o crescimento lateral desses rizomas é muito vigoroso e faz com que a planta produza muitos perfilhos e tenha um crescimento bastante agressivo. Nas demais espécies de *Saccharum* e em cultivares híbridas, esse crescimento horizontal é menos acentuado e as touceiras formadas são mais compactas e pouco invasivas.

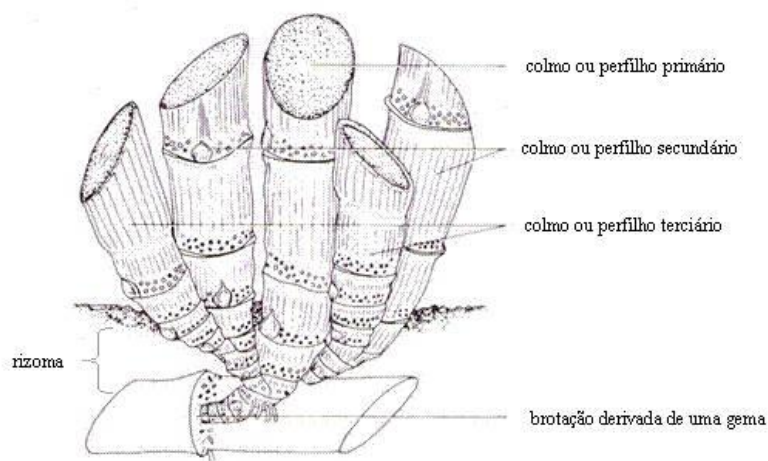


Figura 4 Ilustração representando a formação de uma touceira de cana-de-açúcar com perfilhos formados, a partir de brotos de gemas presentes no rizoma

Fonte: Artschwager et al. (1958 apud JAMES, 2004).

As estruturas apresentadas, neste tópico, por apresentarem variações morfológicas entre espécies e híbridos do gênero *Saccharum*, são comumente utilizadas em estudos de taxonomia ou em descrições para registro e caracterização de novas cultivares.

### **2.3 Melhoramento genético de cana-de-açúcar**

Segundo Matsuoka, Ferro e Arruda (2009), o genoma da cana-de-açúcar é muito complexo e traz grandes desafios para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas. Além disso, por ser um híbrido poliplóide, limita a utilização de sementes, via propagação sexual e mesmo direcionando cruzamentos com parentais selecionados e avaliando centenas de milhares ou mesmo milhões de progênies em ensaios de campo em grande escala, isso limita ganhos genéticos em melhoramento convencional.

Além disso, a família Poaceae necessita de muitos estudos relacionados aos mecanismos de incompatibilidade. A grande complexidade embutida, dentro dos cruzamentos entre espécies parentes, provavelmente é decorrente da variabilidade das interações alélicas. Sua principal função é promover o cruzamento entre indivíduos não parentais (CESNIK; MIOCQUE, 2004).

A incompatibilidade do gênero *Saccharum* é muito conhecida pelos geneticistas, mas foi pouco investigada. A autoincompatibilidade foi mais determinada em *S. robustus*. Já, a macho-esterilidade ocorre com mais frequência em plantas descendentes de *S. sinense* e *S. barberi* do que em *S. officinarum*. Em programas de melhoramento, a macho esterilidade possui uma importância muito grande (CESNIK; MIOCQUE, 2004).

O melhoramento clássico em cana-de-açúcar, por ser uma cultura monocotiledônea e poliplóide, torna-se um processo muito complexo e difícil. As cultivares no mundo são resultado de cruzamento entre *S. officinarum*,

contendo número de cromossomos igual a 10 e *S. spontaneum* contendo 8 cromossomos. Os híbridos interespecíficos entre essas duas espécies resultam em uma complexa constituição cromossômica, variando de  $2n=100-130$ . Os híbridos preservam intactos 15-25% dos cromossomos herdados de *S. spontaneum* e 60-70% herdados de *S. officinarum*. Aproximadamente, 5-10% são provenientes de cromossomos recombinantes entre essas duas espécies (HONT et al., 1996; HONT et al., 1998; MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

#### **2.4 Controle químico de plantas daninhas na cultura de cana-de-açúcar**

Planta daninha é qualquer espécie vegetal que cresce em local e momento não é desejado, compete com as culturas, interfere em seu desenvolvimento e na produção final esperada (LORENZI, 2000). Considerando os fatores bióticos, as plantas daninhas são uns dos componentes que interferem no desenvolvimento e na produtividade da cana-de-açúcar. Estima-se que cerca de 1000 espécies de plantas daninhas habitem o sistema agrícola da cana-de-açúcar, nas diferentes regiões do mundo (AREVÁLO, 1979).

A presença dessas plantas daninhas pode interferir no processo produtivo da cana-de-açúcar, competindo por recursos do meio ambiente, como água, luz e nutrientes, diminuindo a absorção de N, P, K, Ca, Mg, Fe e Zn. É também hospedeiro de pragas, doenças e alguns nematóides comuns à cultura e, também, interferindo nas práticas de colheitas (PITELLI, 1985). Além disso, na cana-de-açúcar, as plantas daninhas podem liberar substâncias químicas alelopáticas e, assim, inibir a brotação da cana-de-açúcar, interferindo na produtividade final (KUYA, 1999). Causam, ainda, redução no número de cortes economicamente viáveis do canavial (BLANCO; OLIVEIRA; COLETI, 1981).

Em média 15% da redução na produção de colmos, no estado de São Paulo, é causada pela ocorrência de plantas daninhas e os gastos para controle correspondem a 30% do custo total da produção da cana-soca e a 20% da produção de cana planta (LORENZI, 1988). Já, para Christoffoleti (1997) e Blanco, Oliveira e Coleti (1981), essas perdas de rendimento podem chegar a 86%, a depender do tipo de densidade de infestação e do período de convivência com a cultura.

O período crítico de interferência da cultura, decorrente da concorrência com plantas daninhas, vai da emergência até 90 dias de idade (JUNHO; SANCHES, 1997). Existem vários métodos de controle das plantas daninhas e Deuber (1997) cita alguns dos principais: controle preventivo, cultural, manual, mecânico e químico. Todos esses métodos de controle possuem prós e contras, podem ter problemas de uso ou causar prejuízo à cultura. Dario, Vicenzo e Silva (1997) enfatizam que o cultivo mecânico pode danificar as plantas de cana-de-açúcar, pelo baixo rendimento e por não eliminar, devidamente, as plantas daninhas próximas às linhas da cultura.

Em decorrência da ineficiência de outros métodos, e da grande quantidade de perdas, o controle de plantas daninhas na lavoura canavieira é de grande importância, considerando as extensas áreas cultivadas.

Pela eficiência dos herbicidas, o controle químico é amplamente utilizado na cultura da cana. Os herbicidas são produtos químicos que atuam nas plantas, podendo afetar reações bioquímicas do metabolismo ou serem degradados, com posterior incorporação dos produtos dessa degradação em substâncias formadas pelas plantas (PEDRINHO; DURIGAN, 2001).

O herbicida é o principal insumo da cultura de cana. Além disso, Procópio et al. (2003) citam que o controle químico é o método mais utilizado por ser econômico e de alto rendimento, em comparação com os outros e,



também, por existir inúmeros produtos eficientes registrados para cana-de-açúcar no Brasil.

O controle químico de plantas daninhas é influenciado por fatores ligados à cultura, as plantas infestantes, as condições climáticas e de solo. Considerando a época de plantio da cana (cana planta de ano e cana planta de ano e meio), ou corte, pode-se determinar as características do clima da umidade do solo e da infestação de plantas daninhas. Com isso, consegue-se programar o uso de herbicidas em condições de pré-plantio, pré-emergência e pós-emergência (CHRISTOFFOLETI, 1997).

## **2.5 O Glifosato**

A propriedade herbicida do glifosato foi descoberta pela empresa Monsanto, em 1970, e a primeira formulação comercial foi lançada nos Estados Unidos, em 1974, como o nome comercial Roundup®. Hoje ele é utilizado em mais de 130 países sendo aplicado para controle de plantas daninhas nas áreas agrícolas, industriais, florestais, residenciais e ambientes aquáticos, de acordo com os registros obtidos em cada país (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

Embora muitas mudanças e inovações surjam conforme as necessidades do mercado, entre elas o advento das culturas transgênicas, a maioria destas inovações não impede o florescimento de ervas daninhas no campo, assim, o uso de herbicidas é destacado.

O glifosato é um herbicida de largo espectro, não seletivo e de pós emergência, muito utilizado na agricultura e outras áreas não cultivadas para o controle de ervas daninhas anuais e perenes. O herbicida é absorvido pelo tecido vivo e translocado, via floema, através da planta para as raízes e rizomas, e sua atuação inibe a atividade de enzimas específicas, suspendendo a síntese de aminoácidos aromáticos.

O glifosato pertence ao grupo químico das Glicinas, recebendo o nome químico de N-Fosfonometil, e sua fórmula estrutural é mostrada na Figura 5.

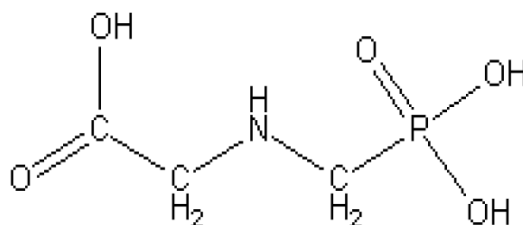


Figura 5 Fórmula estrutural do Glifosato

Fonte: Knuuttila e Knuuttila, 1979.

Conforme indicações da bula do produto comercial, o glifosato é indicado no controle de ervas daninhas anuais e perenes, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, em culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, milho, pastagens, soja (plantio direto ou indireto), fumo, uva e soqueira de cana-de-açúcar. É indicado, ainda, para as culturas de ameixa, banana, cacau, nectarina, pêra, pêsego, seringueira e plantio direto do algodão. Em cana-de-açúcar é ainda usado como agente maturador e também para erradicação e renovação da área plantada.

Em diversos tipos de cultivo, o glifosato costuma ser pulverizado e absorvido na planta, através de suas folhas e dos caulículos novos, sendo transportado por toda a planta agindo, principalmente, na inibição do metabolismo de aminoácidos. As plantas tratadas com glifosato morrem, lentamente, em poucos dias (Figura 6), meia vida por hidrólise de mais de 35 dias (GALLI; MONTEZUMA, 2005; KOLLMAN; SEGAWA, 1995) e, em razão do transporte de princípio ativo por todo o sistema nenhuma parte da planta sobrevive (AMARANTE JUNIOR et al., 2002).



Figura 6 As plantas tratadas com glifosato apresentam um menor crescimento quando comparadas às plantas sem o tratamento com herbicida e morrem em poucos dias por falta de alguns nutrientes essenciais

O número de aplicações feitas com glifosato costuma variar de acordo com as ervas a serem tratadas. Para plantas daninhas perenes, no início da floração, ou para ervas daninhas anuais, antes da floração e formação de sementes, a aplicação é feita em dose única. Para tiririca (*Cyperus rotundus* ou *Cyperus difformes*), em razão da sua fisiologia, são necessárias 3 a 4 aplicações, em intervalos de 20 a 40 dias. Entretanto, no caso da *Digitaria sanguinalis*, o controle é feito em plantas recentemente germinadas até a fase adulta. Apesar da elevada eficiência, o glifosato não tem ação sobre as sementes das ervas no solo e, portanto, deve ser aplicado quando as espécies a serem eliminadas estão em condições de desenvolvimento, sem efeito de estresse hídrico. Para culturas de café, cana-de-açúcar, soja e milho, no entanto, a aplicação é feita somente nas entrelinhas, pela sua baixa seletividade.

O movimento no interior das células é a maior barreira para absorção e translocação de glifosato pelas plantas (HALL; HART; JONES, 2000; NILSSON, 1985). O glifosato é absorvido pelas células, através da difusão passiva ou via um transportador fosfatado ativo pela ATPase da planta (HETHERINGTON et al., 1998). É transportado via floema e se acumula em folhas jovens, raízes e meristemas (BERNARDS et al., 2005; BROMILOW; CHAMBERLAIN, 2000). A absorção foliar é reduzida quando o glifosato é

aplicado em solução de cálcio, ferro, manganês e zinco (BERNARDS et al., 2005; NILSSON, 1985; THELEN; JACKSON; PENNER, 1995; WILLS; MCWHORTER, 1985). Porém, o cloreto de cálcio em solução aumenta a absorção de glifosato em culturas de milho e soja (HETHERINGTON et al., 1998) e, adicionando ferro e manganês, aumenta-se a translocação do glifosato da solução da raiz para as folhas de trigo (BERNARDS et al., 2005; NILSSON, 1985). Quando o glifosato é aplicado em solução com sulfato de amônio, alguns efeitos negativos de cátions divalentes e trivalentes na absorção foliar de glifosato são reduzidos (HALL; HART; JONES, 2000).

A modalidade bioquímica de ação do glifosato em uma via metabólica das plantas, chamado mecanismo do ácido chiquímico, é a causa da sua toxicidade relativamente baixa, similar à existente em alguns microorganismos mais complexos, não existindo em animais (AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

Os sintomas visuais de fitotoxicidade de glifosato causados por queima de folhas ou caule, durante muito tempo foram confundidos com sintomas de deficiências de boro, cálcio, cobre, manganês e zinco. Quando esses sintomas apareciam, por exemplo, em eucalipto, os profissionais das áreas de solo e nutrição florestal eram chamados para realizarem diagnóstico, acreditando que se tratava de um distúrbio nutricional. No entanto, em 50% das ocorrências, o problema era decorrente da fitotoxicidade causada pelo glifosato (SILVEIRA, 2003).

Dados da literatura demonstram que a tolerância de plantas ao glifosato ocorre em razão da penetração ou translocação diferencial desse herbicida na planta (MONQUERO et al., 2004; SANDBERG; MEGGITT; PENNER, 1980; SATICHIVI et al., 2000). As taxas de absorção foliar do herbicida e, conseqüentemente, sua eficácia, estão diretamente ligadas aos tipos de estrutura encontrada na folha e à permeabilidade da cutícula (BAKER, 1982; TUFFI

SANTOS et al., 2006) que, por sua vez, depende da constituição e da polaridade desta. Estudos mostram que nos estômatos e na base dos tricomas a cutícula é mais fina e mais permeável a substâncias polares, sendo uma via de penetração de herbicidas (HESS; FALK, 1990; SCHREIBER, 2005; TUFFI SANTOS et al., 2006). Esse fato pode favorecer a penetração do glifosato em plantas onde a presença dessas estruturas epidérmicas seja frequente.

A produção de plantas transgênicas tolerantes a herbicidas tornou-se bastante atrativa para a agricultura. Os genes que conferem essa característica podem ser encontrados na natureza, ou podem ser obtidos por meio de mutações sítio dirigidas. A tolerância pode ser obtida utilizando-se as seguintes estratégias: 1) estimular a superprodução da enzima na qual o herbicida atua, de forma a gerar quantidade suficiente de enzima que escape a ação inibitória do herbicida; 2) tornar a enzima específica insensível ao herbicida na planta de interesse; 3) introduzir, na planta de interesse, uma enzima com efeito degradante ou desintoxicante, que atue sobre o herbicida (BRASILEIRO; DUSI, 1999; FARAH, 1997).

O glifosato tem amplo espectro de ação e seu efeito tóxico é decorrente da inibição da enzima EPSP sintetase, que atua na biossíntese de aminoácidos (tirosina, fenilalanina e triptofano). A transferência do gene da enzima EPSP sintetase insensível ao glifosato para plantas susceptíveis à inibição pelo glifosato, permite que as plantas transgênicas suportem altas concentrações desse herbicida, já que a enzima insensível garante o funcionamento da via, mesmo, quando a enzima endógena encontra-se inibida pelo glifosato.

Além de genes de tolerância ao glifosato, outros genes que conferem tolerância a outros tipos de herbicidas já foram isolados, e a resistência a esses compostos químicos já foi obtida em mais de uma dezena de espécies de plantas. Como exemplo, pode-se citar o gene *bar* e *bxn* de *Klebsiella ozaenae*, cujos

produtos inativam os herbicidas fosfonotricina (PPT) e bromoxinil, respectivamente (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

## 2.6 A Enzima EPSP sintetase

Segundo Berman et al. (2000), a enzima 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintetase (EPSP sintetase) está envolvida no sexto passo da via do ácido chiquímico e antecede o corismato, ponto intermediário importante. Esse intermediário é indispensável para a síntese de metabólitos aromáticos essenciais: fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 7).

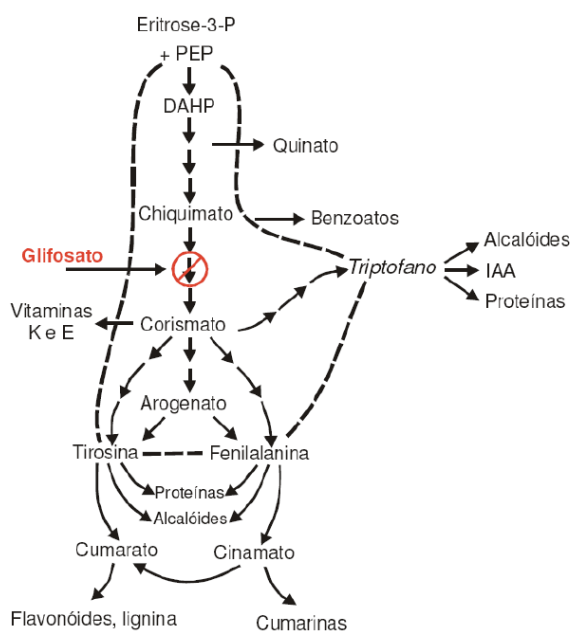


Figura 7 Via do ácido chiquímico: síntese de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano

Na planta, é importante destacar que a auxina ácido indolilacético (IAA), promotora de crescimento, deriva do aminoácido triptofano, através de

várias etapas, envolvendo indolpiruvato ou triptamina ou indoletanol, para produzir indolilacetaldeído ou glucobrassina, para dar indolilacetonitrilo, compostos precursores do IAA. A síntese de IAA é inibida pela ação do glifosato, uma vez que já está bem especificado que o glifosato inibe a síntese de corismato e de triptofano (CAETANO et al., 2009). A síntese de IAA em plantas e bactérias é representada na Figura 8. Nela temos a possibilidade da ocorrência de quatro vias de síntese: a via do ácido indol 3-pirúvico, a via bacteriana, a via indol-3-acetonitrila (IAN) e a viatriptamina (TAM).

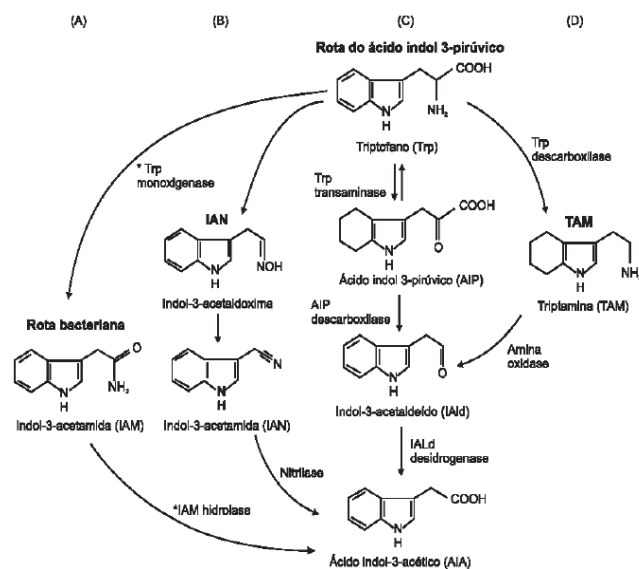


Figura 8 (A), (B), (C) e (D) são vias metabólicas para a obtenção de ácido indolacético

A síntese do IAA tem como precursor o indol-3-glicerol fosfato, que precisa do corismato para sua formação. Como a síntese do corismato também é inibida pelo glifosato, pode-se dizer que a síntese do IAA independente do

triptofano, também pode ser inibida pelo glifosato, ou seja, ele bloqueia totalmente a síntese de IAA.

O glifosato exerce uma rápida redução no conteúdo de auxina nas plantas pela degradação oxidativa de IAA e, também, pela formação de conjugados. Sabe-se, também, que alguns compostos fenólicos são inibidores de IAA-oxidase. Apesar disso, como a síntese de compostos fenólicos é inibida pela ação do glifosato, haverá aumento da atividade de IAA oxidase, o que levará a um aumento na oxidação do IAA e, conseqüentemente, menor nível de IAA livre (TAIZ; ZEIGER, 2008).

A EPSP sintetase catalisa a reação de transferência do enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para chiquimato-3-fosfato (S3P), formando os produtos EPSP e fosfato inorgânico (Pi). Essa reação é apresentada na Figura 9 (BERMAN et al., 2000).

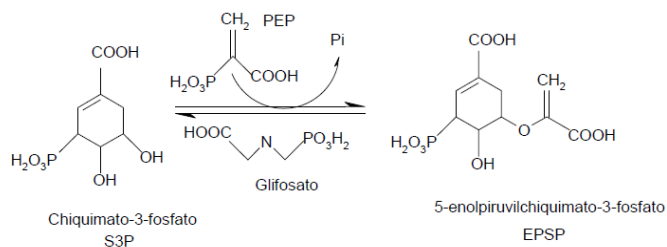


Figura 9 Reação catalizada pela enzima EPSP sintetase com a qual o glifosato compete pelo substrato natural PEP

A EPSP sintetase é o principal alvo molecular do composto glifosato (ARNAUD et al., 1998) e nenhuma outra classe comercial de herbicidas conhecidos inibe essa enzima ou outras enzimas importantes dessa mesma rota. É, entretanto, conhecido que o glifosato pode inibir outras enzimas como DAHP sintetase, dehidroquinosintetase e antramilatosintetase. Todavia, tais inibições



requerem alta concentração de ingrediente ativo (10nM). Dessa forma, a ação do glifosato sobre essas enzimas é, provavelmente, um efeito secundário (FISCHER et al., 1986; ROISCH; LINGENS, 1974). Estudos experimentais realizados em culturas de células de plantas e bactérias suportam a conclusão que a EPSP sintetase é o alvo bioquímico responsável pela poderosa ação do glifosato (ARNAUD et al., 1998).

Uma interação seletiva e específica do glifosato com a EPSP sintetase ocorre, em decorrência das propriedades herbicidas potentes e baixa toxicidade em outras formas de vida. O glifosato inibe a EPSP sintetase em uma reação reversível, na qual é competitivo com o PEP e não competitivo com o S3P. Há evidências que sugerem uma semelhança entre o PEP e o glifosato (ANTON et al., 1983; SIKORSKI; GRUYS, 1997; STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1984).

Vários estudos mostram que o glifosato forma um complexo ternário estável com a enzima EPSP sintetase e o S3P (EPSP sintetase-S3P-glifosato). O complexo ternário EPSP sintetase-S3P-glifosato é semelhante ao complexo EPSP sintetase-S3P-PEP requerido para a catálise. Entretanto, a ligação do glifosato no complexo é mais forte que a ligação do PEP (BOOCOCK; COGGINS, 1983; SIKORSKI; GRUYS, 1997; STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1984).

Sendo assim, o bloqueio da via metabólica do chiquimato, por meio da inibição da EPSP sintetase, pela presença do glifosato, favorece o acúmulo de ácido chiquímico.

## **2.7 Quantificação de ácido chiquímico, por meio da utilização da enzima chiquimato desidrogenase**

Um teste simples foi desenvolvido e pode ser usado para diferentes culturas, para detectar e quantificar o ácido chiquímico em tecido de plantas

(MUELLER et al., 2008; SINGH; SHANER, 1998; WANG, 2001). As vantagens desse ensaio são: especificidade ao ácido chiquímico, rapidez para obtenção dos resultados e por ser um teste colorimétrico pode ser visivelmente observado e qualitativamente avaliado. Assim, esse ensaio pode ser utilizado para determinar sensibilidade e tolerância de plantas ao glifosato.

O ensaio consiste em uma ação combinada entre a enzima chiquimato desidrogenase e a diaforase, que, em presença de ácido chiquímico, produz formazan que é um complexo colorido. A intensidade da cor está diretamente relacionada com a concentração de ácido chiquímico. Sendo assim, a presença de ácido chiquímico pode ser detectada visualmente e a concentração pode ser quantificada com a utilização de espectrofotômetro.

A enzima chiquimato desidrogenase converte ácido chiquímico em desidrochiquimato e reduz NADP em NADPH (SINGH; SHANER, 1998). Em seguida, a diaforase transfere elétrons do NADPH para redução do tetrazólio que se torna colorido quando reduzido (Figura 10).

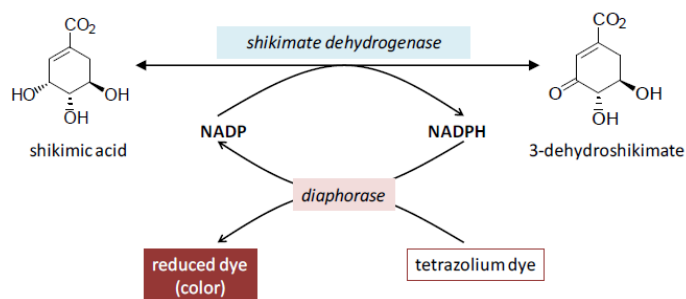


Figura 10 Reação de conversão de ácido chiquímico em tetrazólio reduzido

### 3 MATERIAL E MÉTODO

A resposta ao glifosato de cinco cultivares de cana-de-açúcar (A, B, C, D e E), sendo uma delas geneticamente modificada para tolerância ao glifosato (E), foi avaliada pela incubação de discos foliares em oito soluções de glifosato. As análises foram feitas em micro-placas de 96 poços em um delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial, com duas repetições. Três discos foliares foram colocados em cada poço da placa e representaram uma parcela. O mesmo experimento foi repetido após duas semanas com as mesmas plantas.

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios da Monsanto, situados em Campinas-SP. A propagação, manutenção e coleta das cultivares de cana-de-açúcar foram realizadas em casa de vegetação situada na mesma localidade.

#### 3.1 Ensaio bioquímico para a quantificação de ácido chiquímico

Os discos foliares foram colocados em soluções de glifosato com diferentes concentrações, para que fosse avaliada na forma de curva de dose resposta. As doses de glifosato utilizadas foram 0, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512  $\mu\text{M}$ . A microplaca foi incubada em câmara de crescimento por 24 horas. Esse período foi necessário para que o glifosato atuasse, inibindo a EPSPS nos discos foliares (SINGH; SHANER, 1998). Após incubação, os discos foram macerados e o acúmulo de ácido chiquímico foi quantificado via espectrofotômetro.

As cultivares foram plantadas em casa de vegetação em dezembro 2013 e, após 6 semanas, foram selecionadas as folhas mais jovens emergidas, completamente desenvolvidas, e coletados discos com 6 mm de diâmetro cada. Os discos foram transferidos para a micro-placa, 3 discos por poço e, então, foi adicionada solução de incubação, contendo solução 20mM de  $\text{NH}_4\text{PO}_4$  e

glifosato. A placa foi coberta com papel celofane, submetida a vácuo por 5 minutos, para garantir que os discos estivessem totalmente submersos na solução e incubada por 24 horas em câmara de incubação, com 50 a 150 uE, fotoperíodo de 24 horas a aproximadamente 24°C.

A extração do ácido chiquímico foi iniciada com a maceração dos discos por 2 a 3 minutos ou até que o tecido estivesse completamente macerado. A placa foi centrifugada e 50 uL do sobrenadante foi transferido para uma nova placa de 96 poços, apropriada para leitura em espectrofotômetro, para a quantificação do ácido chiquímico. 60 uL da solução para análise, contendo Tris Buffer (50mM), NADP<sup>+</sup> (0,9mM), MgCl<sub>2</sub> (5mM), INT (0,6mM) e Diaphorase (1U/ml), foi adicionada a cada poço e a reação foi iniciada após adição de 10µL da enzima chiquimato desidrogenase (clonada em *E coli* e diluída 1:1000 usando tampão Tris) – volume final dos poços foi de 200µL ajustado com adição de água Milli Q (SINGH; SHANER, 1998). A microplaca foi deixada em repouso e, no escuro, por 30 minutos, então foi medida a absorbância em espectrofotômetro a 490nm.

### **3.2 Análise estatística**

Os resultados da concentração de ácido chiquímico estimado a partir da absorbância, foram utilizados nas análises de variâncias individuais das amostras. Posteriormente, foi realizada a análise de variância conjunta e o agrupamento das médias por meio do teste de Scott-Knott (1974).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV%) é comparável à de avaliação de caracteres com alta sensibilidade a efeitos não controláveis experimentalmente. Entretanto, observou-se ampla variação entre os tratamentos (Tabela 1).

Além disso, as interações envolvendo os experimentos foram não significativas, confirmando a repetibilidade dos resultados e, por isso, eles foram analisados com base na média dos dois experimentos.

Assim, na análise de variância conjunta, apresentada na tabela 1, pode-se observar diferença significativa entre cultivares e entre doses de glifosato.

Tabela 1 Análise de variância conjunta da concentração de ácido chiquímico em função de diferentes cultivares de cana-de-açúcar e de doses crescentes de glifosato

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Cultivares	4	0,063639	115,31	0
Gifosato	7	0,073532	133,234	0
Experimento	1	0,000544	0,986	0,3238
Cultivares x Glifosato	28	0,007558	13,694	0
Cultivares x Experimento	4	0,000336	0,608	0,6581
Glifosato x Experimento	7	0,000345	0,625	0,7339
Cultivares x Glifosato x Experimento	28	0,000225	0,408	0,9954
Erro	80	0,000552		
CV (%)	25,11			
Média Geral	0,093569			

Matallo et al. (2009), trabalhando com glifosato e concentração de ácido chiquímico em citros, observaram que as plantas que receberam aplicação de glifosato mostraram sempre maiores concentrações de ácido chiquímico que as plantas testemunhas. Vários pesquisadores (MUELLER et al., 2008; SINGH;

SHANER, 1998; WANG, 2001) têm demonstrado que o ácido chiquímico é um marcador seletivo para plantas expostas a subdoses de glifosato. Níveis elevados de ácido chiquímico, detectados a partir de aplicações de glifosato, foram observados em *Conyza canadensis* (KOGER et al., 2005; MUELLER et al., 2008), algodão (PLINE et al., 2002), girassol, trigo e milho (HENRY; SHANER, 2007), soja (SINGH; SHANER, 1998) e trigo (BRESNAHAN et al., 2003). No entanto, Pline et al. (2002) e Singh e Shaner (1998) mostraram que plantas transgênicas resistentes ao glifosato não acumulam grandes quantidades de ácido chiquímico após a aplicação do herbicida.

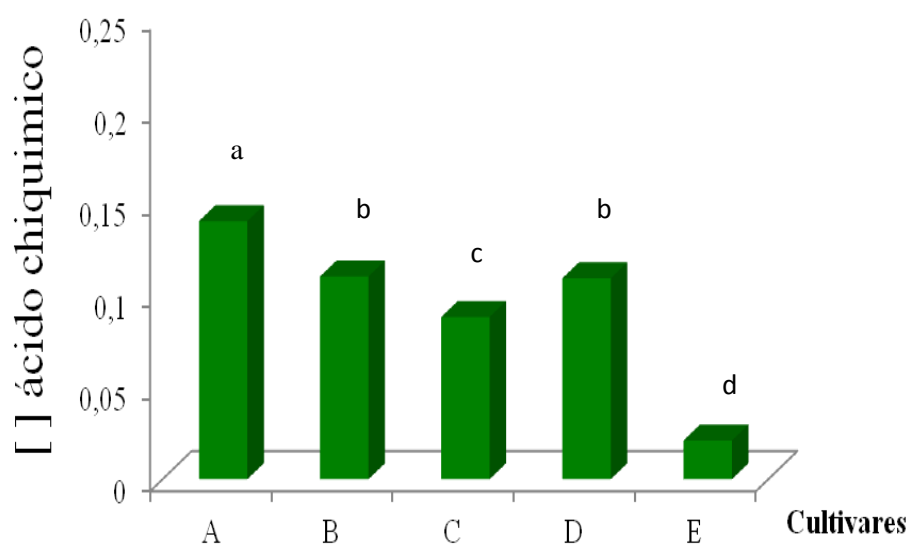


Figura 11 Média da concentração de ácido chiquímico nas cultivares de cana-de-açúcar pela análise conjunta dos dois experimentos. Desvio padrão = 0,023; CV = 25,1

Baseado nos resultados apresentados na Figura 11, pode-se verificar que o acúmulo de ácido chiquímico na cultivar E foi significativamente menor do

que nas outras cultivares analisadas. Trabalhos previamente realizados também mostram que o acúmulo de ácido chiquímico foi observado em cultivares convencionais de milho, soja e algodão, mas não foi observado em cultivares geneticamente modificadas das mesmas culturas (HENRY; CRAWFORD; PHILLIPS, 2004; PLINE et al., 2002; SHANER; STEINBACH;TSIEN, 2005; SINGH; SHANER, 1998).

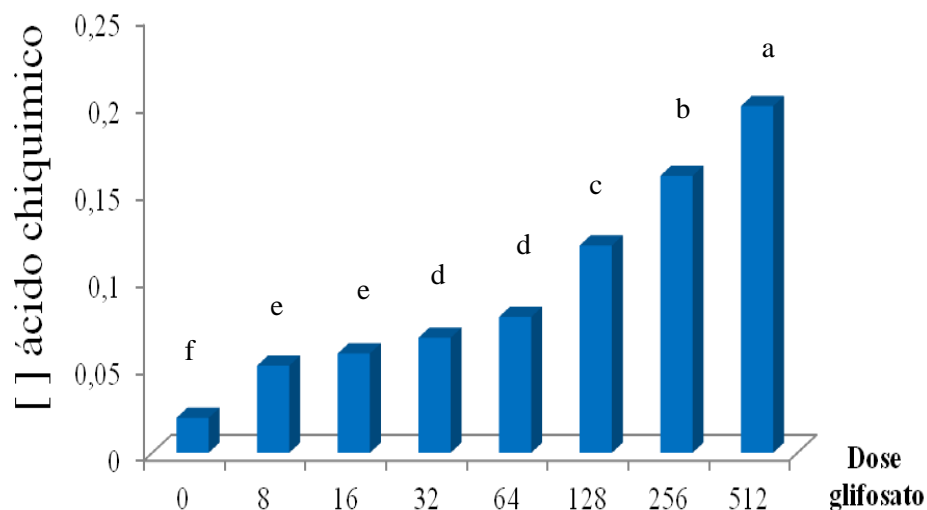


Figura 12 Média da concentração de ácido chiquímico em cana-de-açúcar em função das doses de glifosato na análise conjunta dos dois experimentos. Desvio padrão = 0,023; CV = 25,1

Com base na Figura 12, pode-se assumir, também, que os discos foliares expostos às diferentes doses de glifosato acumulam, proporcionalmente, as maiores concentrações de ácido chiquímico. Quanto maior a dose de glifosato, maior a concentração acumulada de ácido chiquímico, e essa diferença chegou até a 5 vezes ou, aproximadamente, 20%.

Tabela 2 Médias da concentração de ácido chiquímico em cultivares de cana-de-açúcar tratadas com doses crescentes de glifosato. Análise conjunta dos experimentos

[ ] Glifosato	Cultivares				
	A	B	C	D	E
0	0,021 dA <sup>1</sup>	0,021 eA	0,021 cA	0,018 eA	0,020 aA
8	0,037 dB	0,066 dA	0,052 cA	0,071 dA	0,022 aB
16	0,065 cA	0,068 dA	0,057 cA	0,073 dA	0,021 aB
32	0,097 cA	0,079 dA	0,057 cA	0,077 dA	0,022 aB
64	0,085 cB	0,129 cA	0,061 cC	0,096 cB	0,020 aD
128	0,209 bA	0,127 cB	0,114 bB	0,123 cB	0,020 aC
256	0,295 aA	0,162 bB	0,156 aB	0,161 bB	0,021 aC
512	0,311 aA	0,229 aB	0,186 aC	0,250 aB	0,021 aD
Erro padrão	0,012				
CV(%)	25,11				

<sup>1</sup> Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de comparação de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Como houve interação significativa de cultivares por doses de glifosato (Tabela 1), identificou-se a reação de cada cultivar às diferentes doses de herbicida, bem como o efeito de cada dose nas cinco cultivares (Tabela 2).

Com base nos resultados observados na tabela 3 e, também, nos resultados apresentados nas Figuras 13 a 19, é possível verificar que a dose de glifosato de 128  $\mu\text{M}$  aparentemente é a melhor que permite discriminar as cultivares. Com base nos resultados expostos nas tabelas 2 e 3, também pode-se verificar que a cultivar A é a mais suscetível, as cultivares B, C e D mostram respostas bem parecidas, o que pode sugerir que são, geneticamente, similares enquanto a cultivar E é a mais tolerante a todas as doses, como esperado e mostrado na literatura, indicando a eficiência do transgênico para a tolerância ao glifosato.



A partir dos resultados obtidos e observados nas Figuras 13 e 17, pode-se verificar que podem ocorrer diferentes níveis de tolerância ao glifosato entre diferentes cultivares convencionais de cana-de-açúcar, mesmo verificando que o glifosato mata, de forma eficiente, as cultivares avaliadas, exceto a cultivar E. O mesmo pode ser observado nas análises de regressão listadas abaixo.

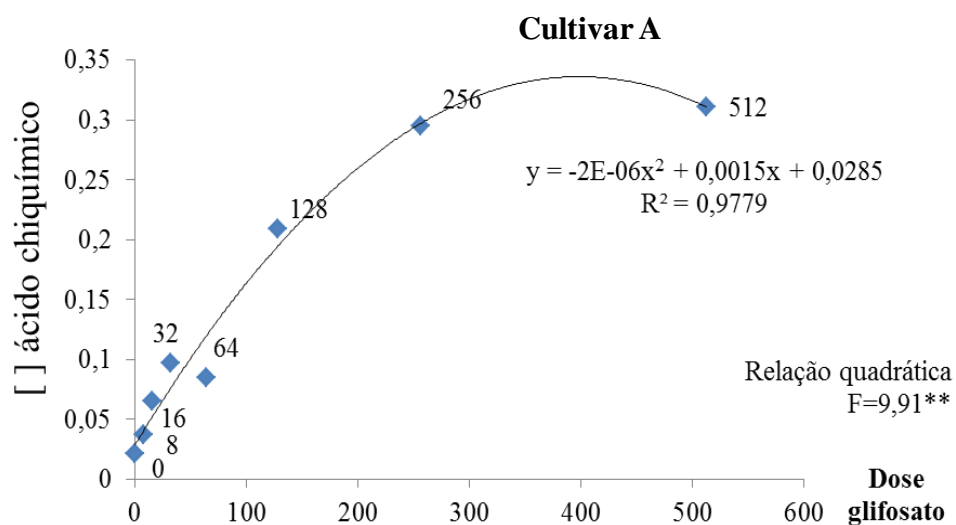


Figura 13 Análise de regressão para a concentração de ácido chiquímico em função de doses crescentes de glifosato na cultivar A de cana-de-açúcar, indicando significância a 1% para relação quadrática

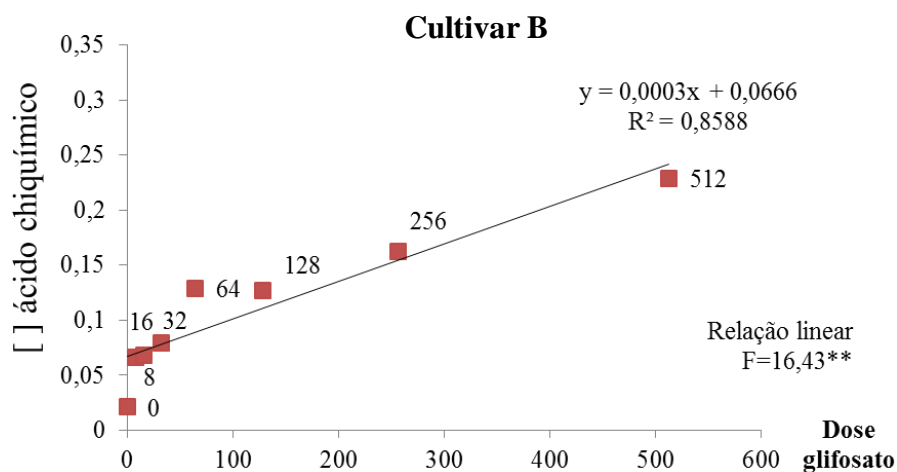


Figura 14 Análise de regressão para a concentração de ácido chiquímico em função de doses crescentes de glifosato na cultivar B de cana-de-açúcar, indicando significância a 1% para relação quadrática

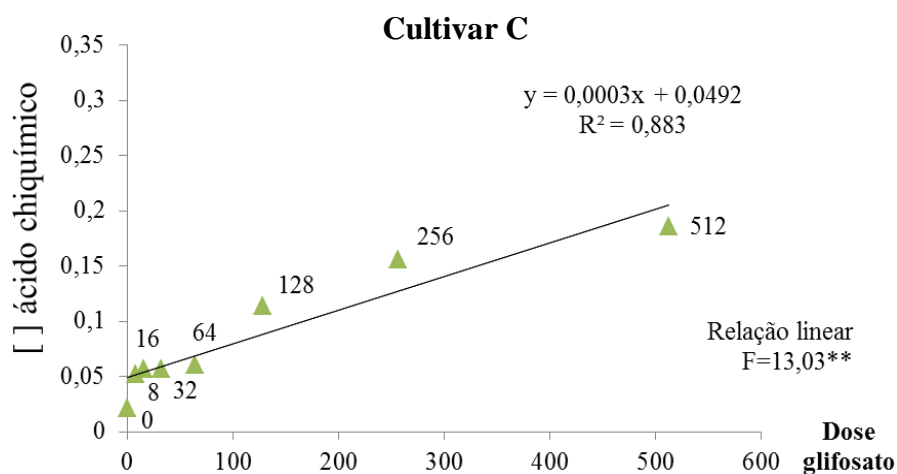


Figura 15 Análise de regressão para a concentração de ácido chiquímico em função de doses crescentes de glifosato na cultivar C de cana-de-açúcar, indicando significância a 1% para relação quadrática

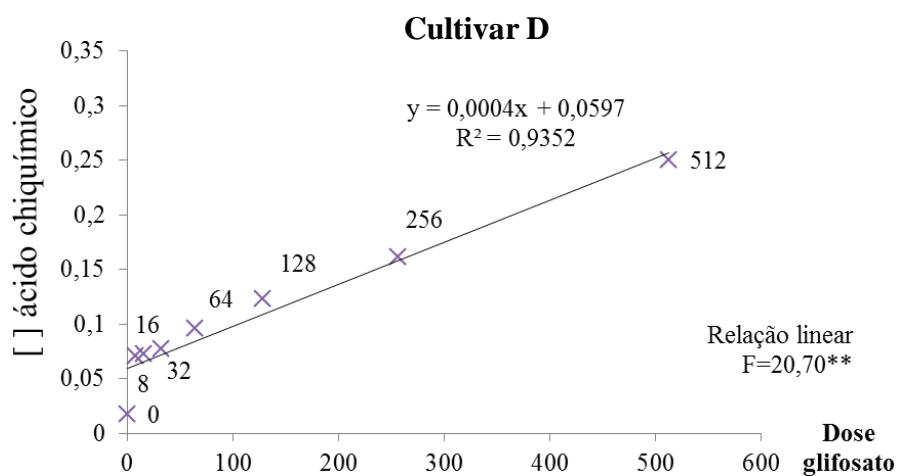


Figura 16 Análise de regressão para a concentração de ácido chiquímico em função de doses crescentes de glifosato na cultivar D de cana-de-açúcar, indicando significância a 1% para relação quadrática

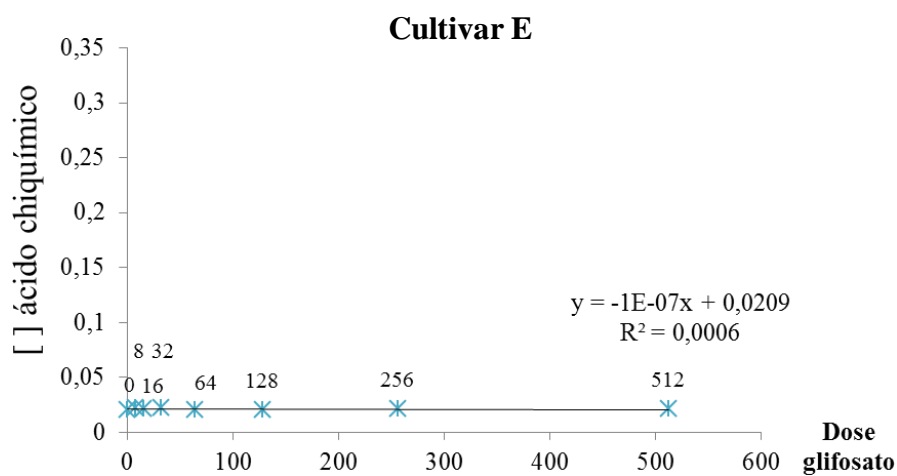


Figura 17 Análise de regressão para a concentração de ácido chiquímico em função de doses crescentes de glifosato na cultivar E de cana-de-açúcar, indicando significância a 1% para relação quadrática

A tolerância de populações de plantas convencionais a herbicidas pode estar relacionada com a afinidade enzimática das moléculas; com a absorção, translocação ou exclusão diferencial dos herbicidas, ou mesmo com rotas de detoxificação metabólica. Segundo Feng et al. (2004), a translocação reduzida do glifosato para os pontos de crescimento da planta e para as raízes, juntamente com a possível compartimentalização do produto dentro da planta, são mecanismos responsáveis pela tolerância. Outros estudos demonstram que a tolerância de plantas ao glifosato ocorre, pela penetração ou translocação diferencial desse herbicida na planta (MONQUERO et al., 2004; SANDBERG; MEGGITT; PENNER, 1980; SATICHIVI et al., 2000). As taxas de absorção foliar do herbicida e, conseqüentemente sua eficácia, podem estar diretamente ligadas aos tipos de estrutura encontrados na folha e à permeabilidade da cutícula (BAKER, 1982; TUFFI SANTOS et al., 2006) que, por sua vez, depende da constituição e da polaridade desta. Estudos mostram que nos estômatos e na base dos tricomas a cutícula é mais fina e mais permeável a substâncias polares, sendo uma via de penetração de herbicidas (HESS; FALK, 1990; SCHREIBER, 2005; TUFFI SANTOS et al., 2006). Esse fato pode favorecer à penetração do glifosato em plantas, onde a presença dessas estruturas epidérmicas seja frequente.

Contudo, maiores estudos devem ser realizados para esclarecer quais os fatores têm participação nessa resposta diferencial. Em resumo, não está claro como ocorre a regulação da rota do ácido chiquímico, afetada pela aplicação do glifosato nas plantas, e se os sistemas de controle nas várias espécies de plantas e microorganismos são similares, no entanto, as poucas informações disponíveis indicam que não (VELINI et al., 2009).

Este trabalho demonstrou, também, a efetividade do método colorimétrico utilizado para determinação e quantificação de ácido chiquímico em cultivares de cana-de-açúcar. Os ensaios são rápidos e permitem análise de

várias amostras ao mesmo tempo, quando a extração é feita em microplacas de 96 poços. Outros métodos descritos na literatura são mais trabalhosos e necessitam de mais tempo e equipamentos mais sofisticados (LYDON; DUKE, 1988; PLINE et al., 2002).

O presente estudo permite-nos concluir, também, que para cada cultivar existe uma dose mais econômica para erradicação e estudos, comparando fenótipos observados em casa de vegetação, após aplicação de glifosato e resultados de disco foliar seriam interessantes para essas estimativas e para estabelecimento de dose resposta em disco foliar versus resultados da aplicação *in vivo*.

## 5 CONCLUSÕES

- a) O método colorimétrico é eficiente para detectar a sensibilidade de cana-de-açúcar ao glifosato;
- b) A sensibilidade ao glifosato das cultivares não transgênicas é variável, embora todas sejam sensíveis ao herbicida;
- c) A cultivar transgênica mostrou-se resistente ao glifosato pelo não acúmulo de ácido chiquímico.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, F. E. Molecular markers for early câncer detection. **Journal of Environmental Science and Health**, New York, v.18, p.75-125, 2000.
- ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**: recomendações para o uso adequado em plantio direto e convencional. Londrina: IAPAR, 1985.
- AMARANTE JÚNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, out. 2002.
- ANTON, D. L. et al. Mechanism of enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase exchange of phosphoenolpyruvate with solvent protons. **Biochemistry**, New York, v. 22, n. 25, p. 5903-5908, Dec. 1983.
- ARANTES, F. C. et al. Adaptability and stability in rubber tree progenies under different environmental conditions. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 73, p. 37-44, já./mar. 2013.
- AREVÁLO, R. A. **Plantas daninhas de cana-de-açúcar**. Araras: IAA, 1979.
- ARTSCHWAGER, E.; BRANDES, E. W. **Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)**: origin, classification, characteristics, and descriptions of representative clones. Washington: Agricultural Research Service, 1958.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE VEÍCULOS AUTOMOTORES. Disponível em: <[http:// www.anfavea.com.br/](http://www.anfavea.com.br/)>. Acesso em: 14 dez. 2013.
- BAKER, E. A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: CUTLER, D. F.; ALVIN, K. L.; PRICE, C. E. (Eds.). **The plant cuticle**. London: Academic Press, 1982. p. 140-161.
- BARBER, C. A. The origin of sugarcane. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 22, p. 249-251, 1920.
- BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 235-242, Jan. 2000.

BERNARDS, M. L. et al. Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on glyphosate absorption and translocation. **Weed Science**, Champaign, v. 53, p. 787-794, 2005.

BLANCO, G. H.; OLIVEIRA, A. D.; COLETI, J. T. Competição entre plantas daninhas e a cultura de cana-de-açúcar. II. Período de competição produzido por uma comunidade natural de mato, com predomínio de gramíneas, em cultura de ano. III. Influência da competição na nutrição da cana-de-açúcar. **O Biológico**, São Paulo, v.47, n.3, p.77-88, 1981.

BOOCOCK, M. R.; COGGINS, J. R. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 154, n. 1, p. 27-33, 1983.

BORBA, M. M. Z.; BAZZO, A. M. Estudo econômico do ciclo produtivo da cana-de-açúcar para reforma de canavial, em área de fornecedor do estado de São Paulo. In: CONGRESSO SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, Sober, 2009.

BRASIL. **Anuário estatístico de agroenergia**. Brasília: MAPA, 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 26 jun. 2012b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Intercâmbio comercial do agronegócio: principais mercados de destino**. Brasília: MAPA, 2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 25 jun.2012a.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Matriz energética nacional 2030**. Brasília: Ministério de Minas e Energia, 2007.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. **Exportações brasileiras de etanol**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio, 2012. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 26 jun. 2012c.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas: volume 2**. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. Parte 6, p.679-735.



BRESNAHAN, G. A. et al. Glyphosate applied preharvest induces shikimic acid accumulation in hard red spring wheat (*Triticum aestivum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 14, p. 4004-4007, 2003.

BROMILOW, R. H.; CHAMBERLAIN, K. The herbicide glyphosate and related molecules: physicochemical and structural factors determining their mobility in phloem. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 4, p. 368-373, Apr. 2000.

CABRAL, A. R. **Características fitotécnicas e isoenzimáticas em cana-de-açúcar após a aplicação de glyphosate**. 2012. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2012.

CAETANO, M. S. et al. Analysis of wild-type and Gly96Ala mutant EPSP synthase structures via in silico docking with inhibitors and molecular dynamics simulation. **Current Bioactive Compounds**, Essex, v. 5, n. 2, p. 110-118, 2009.

CARNEIRO, V. T. C. et al. Protoplastos: cultura e aplicações de células vegetais. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**: volume 1. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. p. 413-458.

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

CHRISTOFFOLETI, P. J. Manejo de plantas daninhas em cana-de-açúcar. **Sinal Verde**, São Paulo, v.10, n.19, p.12-14, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: cana-de-açúcar: 3º levantamento. Brasília: CNA, 2011.

CONFEREÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA. **Bioetanol**: o futuro renovável. Brasília: CNI, 2012. Disponível em: <[HTTP://www.cnisustentabilidade.com.br/docs/FNS\\_RIO20\\_web.pdf](http://www.cnisustentabilidade.com.br/docs/FNS_RIO20_web.pdf)>. Acesso em: 10 fev. 2014.

DANIELS, J. et al. The origin of the genus *Saccharum*. **Sugarcane Breeding Newsletter**, Oxford, v. 36, p. 24-39, 1975.

DANTE, R. A.; CRISTOFOLETTI, P. T.; GERHARDT, I. R. Engineering advantages, challenges and status of sugarcane and other sugar-based biomass resources. In: MASCIA, P. N.; SCHEFFRAN, J.; WIDHOLM, J. M. (Org.). **Biotechnology in agriculture and forestry plant biotechnology for sustainable production of energy and co-products**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. p. 87-109.

DARIO, G. J. A.; VICENZO, M. C.; SILVA, M. S. F. da. Avaliação da eficiência do herbicida flazasulfuron no controle de plantas daninhas ocorrentes na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Revista Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v.22, p.102-106, 1997.

DEUBER, R. **Ciência das plantas infestantes: manejo: volume 2**. Campinas: Degaspari, 1997.

D'HONT, A. et al. Characterization of the double genomes structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. Molecular and General Genetics, New York, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996.

D'HONT, A. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 221-225, 1998.

DILLEWIJN, C. V. **Botany of sugarcane**. Waltham: Chronica Botanica, 1952.

DILLON, S. L. et al. Domestication to Crop improvement: genetic resources for sorghum and *Saccharum* (Andropogoneae). **Annals of Botany**, London, v. 100, p. 975-989, July 2007.

FARAH, S. B. **DNA segredos e mistérios**. São Paulo: SARVIER, 1997.

FENG, P. C. C. et al. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, Champaign, v. 52, n. 4, p. 498-505, July 2004.

FERRARI, F. **Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., Poacea)**. 2010. 91 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FIGUEIRA, S. R.; BURNQUIST, H. L. Perspectivas para o setor sucroalcooleiro brasileiro nos programas de álcool combustível da União Européia, Japão e Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 46., 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: SOBER, 2008.

FINER, J. J.; FINER, K. R.; SANTARÉM, E. R. Plant cell transformation, physical methods for. In: MEYERS, R.A. **Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine**. Weinheim: VCH Publishers, 1996. p. 458-65.

FISCHER, R. S. et al. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in eubacteria. **Journal Bacteriology**, Oxford, v. 168, n. 3, p. 1147-1154, Dec. 1986.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

GALLI, A. J. B. A molécula glyphosate e a agricultura brasileira. In: VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Botucatu: Fepaf, 2009.p. 17-19.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, H. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: ACADCOM, 2005.

GRASSL, C. O. Problems relative to the origin and evolution of wild and cultivated Saccharum. **Indian Journal of Sugarcane Research and Development**, Stuttgart, v. 8, n. 2, p. 106-116, July 1964.

GRIVET, L.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. Molecular evidence of sugarcane evolution and domestication. In: MOTLEY, T. J.; ZEREGA, N.; CROSS, H. **Darwin's harvest: new approaches to the origins, evolution, and conservation of crops**. New York: Columbia University Press, 2006.p. 1-25.

GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. **Plant amino acids: biochemistry and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.

HALL, G. J.; HART, C. A.; JONES, C. A. Plants as sources of cations antagonistic to glyphosate activity. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, p. 351-358, 2000.

HARRING, T.; STREIBIG, J. C.; HUSTED, S. Accumulation of shikimic acid: a technique for screening glyphosate efficacy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 10, p. 4406–4412, Sept. 1998.

HENRY, B. W.; SHANER, D. L.; WEST, M. S. Shikimate accumulation in sunflower, wheat and proso millet after glyphosate application. **Weed Science**, Champaign, v. 55, n. 1, p. 1-5, Jan. 2007.

HENRY, J. D.; CRAWFORD, J. R.; PHILLIPS, L. H. Verbal fluency performance in dementia of the Alzheimer's type: A meta-analysis. *Neuropsychologia*, Oxford, v. 42, n. 9, p. 1212–1222, 2004.

HESS, F. D.; FALK, R. H. Herbicide deposition on leaf surfaces. **Weed Science**, Champaign, v. 38, n. 3, p. 280-288, 1990.

HETHERINGTON, P. R. et al. Absorption and efflux of glyphosate by cell suspensions. **Journal and Experimental Botany**, Elmsford, v. 49, p. 527-533, 1998.

HITCHCOCK, A. S. Type species of the first 100 genera of Linnaeus "Species Plantarum". **Botanical Society of America**, Essex, p. 510-517, Jan. 1923.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONOMICA APLICADA. **Combustível com futuro**: Brasil precisa investir para aproveitar crescimento do consumo mundial de álcool. Brasília: IPEA, 2013. Disponível em: <[http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1480:catid=28&Itemid=23](http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=1480:catid=28&Itemid=23)>. Acesso em: 23 fev. 2014.

JAMES, C. **Global status of commercialized Biotech/GM Crops**: 2010. Ithaca: ISAAA, 2010.

JAMES, G. L. An introduction to sugarcane. In: JAMES, G. L. (Ed.). **Sugarcane**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004, p. 1-18.

JUNHO, J. A. C.; SANCHEZ, S. V. Cana-de-açúcar (*Saccharum hybridas*). In: COORDENADORIA DE ASSISTENCIA TECNICA E INTEGRAL. **Manual técnico das culturas**. 2. ed. Campinas: [s.n.], 1997. p. 257-287.

KNUUTTILA, P.; KNUUTTILA, H. The crystal and molecular structure of N-(phosphonomethyl)-glycine (glyphosate). **Acta Chemica Scandinavia B**, Norwegian, v. 33, n. 9, p. 623-626, Apr. 1979.

KOGER, C. H. et al. Rice (*Oryza sativa*) response to drift rates of glyphosate. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 61, n.12, p.1161-1167, Dec. 2005.

KOLLMAN, W.; SEGAWA, R. **Interim report of the pesticide chemistry database**. Sacramento: Environmental hazards Assessment Program, 1995.

KRUSE, N. D.; MICHELANGELO, M. T.; VIDAL, A. V. Herbicidas Inibidores da EPSPs: Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Maringá, v. 1, n. 2, p. 139-146, 2000.

KUVA, M. A. **Efeitos de períodos de convivência e de controle das plantas daninhas na cultura de cana de açúcar (*Saccharum spp.*) no estado de São Paulo**. 1999. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: IAC, 2008.p. 631-670.

LANNEREE, B.; MONIER, V. **Bioethanol in France and Spain**. Paris: T. N. Sofres, 2000.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.

LORENZI, H. Plantas daninhas e seu controle na cultura de cana-de-açúcar. In: SEMINARIO DE TECNOLOGIA AGRONOMICA, 4., Piracicaba. **Anais...** São Paulo: COOPERSUCAR, 1988. p. 281-301.

LYDON, J.; DUKE, S. O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 36, n. 4, p. 813–816, July 1988.

MATALLO, M. B. et al. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, nesp. p. 987-994, Dec. 2009.

MATHUR, J.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 4, p. 221-226, Jan. 1995.

- MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 45, n. 2, p. 372-381, Apr. 2009.
- MEHRLE, W.; ZIMMERMANN, U.; HAMPP, R. Evidence for asymmetrical uptake of fluorescent dyes through electropermeabilized membranes of *Avena mesophyll* protoplasts. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 185, p. 89-94, Feb. 1985.
- MONGELARD, J. E. The effect of different water regimes on the growth of two sugar cane varieties. In: INTERNATIONAL SOCIETY SUGAR TECHNOLOGISTS, 13., 1968, [S.l.]. **Proceedings...** [S.l.: s.n.], 1968. p. 643-651.
- MONQUERO, P. A. et al. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.22, n.2, p.203-210, jul./set. 2004.
- MUELLER, T. et al. Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application. **Weed Research**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 455-460, Oct. 2008.
- MUKHERJEE, S. K. Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette**, New York, v. 119, p. 55-61, 1957.
- NILSSON, G. Interactions between glyphosate and metals essential for plant growth. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. Chapt. 4, p. 35-47.
- OMETTO, J. C. **Bioclimatologia vegetal**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981.
- PEDRINHO, A. F. F.; DURIGAN, J. C. Controle de capim-colonião na cultura de cana-de-açúcar com herbicidas aplicados em pré-emergência. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v. 2, n. 3, p. 125-131, Feb. 2001.
- PITELLI, R. A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.129, p.16-27, set. 1985.
- PLINE, W. A. et al. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and non glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 3, p. 506-512, Jan. 2002.

PROCÓPIO, S. O. et al. **Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**. Viçosa: Suprema, 2003.

RAGHAVAN, T. S.; GOVINDASAMY, S. Phylogeny of *Saccharum* and related genera. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, Washington, v. 9, p. 695-708, 1956.

RAO, J. T. Sugarcane origin, taxonomy, breeding and varieties. In: RAO, J. T. (Ed.). **Sugar cane varietal improvement**. Coimbatore: ICAR, 1987. p. 67-82.

ROISCH, U.; LINGENS, F. Effect of the herbicid N-phosphonomethylglycine on the biosynthesis of aromatic amino acids. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 13, n. 6, p. 400, June 1974.

SANDBERG, C. L.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Absorption, translocation and metabolism of <sup>14</sup>C-glyphosate in several weed species. **Weed Research**, Oxford, v. 20, p. 195-200, 1980.

SATICHIVI, N. M. et al. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**, Champaign, v. 48, p. 675-679, 2000.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: IAC, 2008. p. 85-102.

SCHREIBER, L. Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 7, p. 1069-1073, June 2005.

SCOTT, A.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SHANER, N. C.; STEINBACH, P. A.; TSIEN, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. **Nature Methods**, New York, v. 2, n. 12, p. 905-909, Dec. 2005.

SHEEN, J. Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, n. 4, p. 1466-1475, Dez. 2001.

SIKORSKI, J. A.; GRUYS, K. Understanding Glyphosate's molecular mode of action with EPSP synthase: evidence favoring an allosteric inhibitor model. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 30, n. 1, p. 2-8, Jan. 1997.

SILVA, M. A.; CARLIN, S. D.; CAPUTO, M. M. Tipos de colheita e épocas de aplicação de glifosato na erradicação de soqueiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 43-49, jan. 2006.

SILVEIRA, R. L. V. de A. Fitotoxicidade de glifosato em eucalyptus. **Addubare**, Piracicaba, v. 2, n. 9, p. 4-7, out./dez. 2003.

SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v. 12, p. 527-530, 1998.

SOUZA, E. L. L. de et al. **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. Brasília: ÚNICA, 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/multimedia/publicacao/>>. Acesso em: 18 fev. 2014.

STEINRUCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *klebsiella-pneumoniae*: 1., purification and properties. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 143, n. 4, p. 341-349, Aug. 1984.

STUDART-GUIMARÃES, C. et al. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 167-178, Jan. 2003.

SUBRAMANIAN, K. Morphological descriptors and agriculture characteristics. In: SANKARANARAYANAN, P.; NATARAJAN, B. V. (Ed.). **Sugarcane varieties in India**. Coimbatore: ICAR, 1987. p. 656-660.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

THELEN, K. D.; JACKSON, E. P.; PENNER, D. The basis for the hardwater antagonism of glyphosate activity. **Weed Science**, Champaign, v. 43, p. 541-548, 1995.

THOMPSON, G. D. Water use by sugarcane. **South African Sugar Journal**, Durban, v. 60, n. 8, p. 627-635, 1976.

TUFFI SANTOS, L. D. et al. Características da epiderme foliar de eucalipto e seu envolvimento com a tolerância ao glyphosate. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p. 513-520, 2006.



VAN DILLEWIJN, C. **Botany of sugarcane**. New York: Stechert-Hafner, 1952.

VELINI, E. D. et al. Modo de ação do glyphosate. In: VELINI, E. D. et al.

**Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, 2009. p. 113-134.

VELLINI, E. D. et al. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 64, n. 4, p. 489-496, Apr. 2008.

WANG, C. Y. Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, Champaign, v. 15, n. 1, p. 628-635, Feb. 2001.

WILLS, G. D.; MCWHORTER, C. G. Effect of inorganic salts on the toxicity and translocation of glyphosate and MSMA in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Science**, Champaign, v. 33, p. 755-761, 1985.