

RACHEL SOARES RAMOS

**EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

RACHEL SOARES RAMOS

**EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 08 de julho 2011.

Profa. Marília Contin Ventrella
(Co-orientador)

Prof. Luiz Alexandre Peternelli
(Co-orientador)

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. José Maria Moreira Dias

Prof. Márcio Henrique Pereira Barbosa
(Orientador)

Aos meus pais, Domingos e Cida,
que são os alicerces de nossas vidas;
Aos meus irmãos, Raphael e Regiane,
que são os pilares da minha vida,
Ofereço

Ao Sergio, pela amizade e pelo companheirismo, por me apoiar nos momentos de
alegria e nos momentos de dificuldade,
Dedico.

“Tudo vale a pena, se a alma não é pequena.” Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por me conceber a oportunidade de conhecer pessoas que me ensinaram a não desistir nunca dos meus sonhos e continuar sempre caminhando nos momentos difíceis da vida.

Ao Professor Márcio Henrique Pereira Barbosa pela oportunidade, confiança, orientação, paciência, dedicação e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia pela oportunidade de realização do Curso.

Ao professor Edgard Picolli pela disponibilidade em ajudar e pelas valiosas sugestões nos trabalhos de cultura de tecidos e anatomia.

Ao professor Wagner Campos Otoni pela amizade e pelas sugestões e contribuições.

Ao professor Luiz Alexandre Peternelli pela disponibilidade em ajudar nas análises estatísticas.

À professora Marília Contin Ventrella pelas sugestões nos trabalhos de anatomia.

Ao professor José Maria Moreira Dias, pela amizade e sugestões.

Ao Márcio Rocha pela boa vontade de me ensinar as técnicas da cultura de tecidos vegetais e pela amizade.

À Cenira, pela amizade.

À Cristiane, Emanuelle, pela amizade e pela ajuda nos trabalhos de laboratório. Sempre serei imensamente grata a vocês.

À Elisa, Vanessa pela ajuda e companhia no laboratório de cultura de tecidos.

Aos bolsistas, Marcone, Caroline, pela amizade e dedicação aos trabalhos no laboratório.

Aos estudantes Welligson e Rafaela pela amizade e ajuda nos trabalhos no laboratório de anatomia.

Ao Victor e Mateus por nos ajudar em vários momentos no laboratório de anatomia.

Aos professores do DFT que contribuíram para meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, Sr. Sebastião, Rita, Luizinho, Tatiani pela amizade e disponibilidade em ajudar.

Ao Grupo do Programa de Melhoramento de Cana-de-Açúcar pela amizade.

Aos amigos de curso, pelos momentos de alegria e estudo.

Ao meu pai que nunca desistiu diante das dificuldades e que sempre nos incentivou a estudar.

À minha mãe pelos sacrifícios e lutas para que conseguíssemos chegar até aqui.

Aos meus queridos irmãos, Raphael e Regiane, que estão presentes em minha vida com carinho e dedicação.

À família Soares e Ramos pelas orações, pela torcida e carinho.

Ao Sergio, pela cumplicidade, companhia, carinho, por estar junto comigo nos momentos difíceis e por acreditar que eu seria capaz.

À família Louro e Borges pela amizade e torcida.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade.

BIOGRAFIA

RACHEL SOARES RAMOS, filha de Domingos Sávio de Oliveira Ramos e Maria Aparecida Soares Ramos, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 26 de julho de 1982.

Em julho de 2009, graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Em agosto de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para a obtenção a título *Magister Scientiae*, no dia 08 de julho de 2011.

Em agosto do mesmo ano iniciou o curso de Doutorado pela mesma instituição no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. A cana-de-açúcar.....	4
2.2. Embriogênese somática.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Desinfestação do material	11
3.2. Indução da embriogênese somática.....	12
3.3. Multiplicação dos calos embriogênicos.....	14
3.4. Maturação dos embriões somáticos.....	14
3.5. Germinação dos embriões somáticos.....	15

3.6. Microscopia de luz.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Desinfestação do material.....	18
4.2. Indução da embriogênese somática.....	18
4.3. Multiplicação dos calos embriogênicos.....	21
4.4. Maturação dos embriões somáticos.....	23
4.5. Germinação dos embriões somáticos.....	27
4.6. Microscopia de luz.....	28
5. CONCLUSÕES.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
7. ANEXO.....	50

RESUMO

RAMOS, Rachel Soares, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Efeito de reguladores de crescimento na embriogênese somática de cana-de-açúcar.** Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Co-orientadores: Luiz Alexandre Peternelli e Marília Contin Ventrella.

A embriogênese somática é o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de reguladores de crescimento nas diferentes fases da embriogênese somática de três cultivares de cana-de-açúcar, RB 867515, RB928064 e RB925345, e caracterizar os efeitos dos tratamentos *in vitro* no desenvolvimento anatômico dos embriões somáticos. Foram obtidos calos embriogênicos após inoculação de folhas imaturas advindas de gemas laterais em meio MS acrescido de 30g.L de sacarose, 2,5g.L de ágar e diferentes concentrações de 2,4-D, Dicamba e CPA (5,10,15 e 20 μ M). Aos 30 dias após indução verificou-se que a dose de 20 μ M de 2,4-D foi a dose que induziu maior porcentagem de calos embriogênicos, 36,95%, sendo que estes calos tinham aspecto compacto e eram de coloração esbranquiçada. Os calos foram subcultivados no mesmo meio por mais 30 dias e após esse período, os calos embriogênicos obtidos foram transferidos para meio com baixa concentração de 2,4-D (2,26 μ M) para obtenção de embriões globulares. Os embriões globulares foram transferidos para meio de multiplicação composto do mesmo meio de indução, acrescido de três diferentes doses de AIA (6, 12 e 24 μ L/placa) e foi observada diferença significativa entre

as variedades testadas, sendo que na maior dose ocorreu maior multiplicação de calos embriogênicos. Após 30 dias foram transferidos para meio de maturação, onde foram testados os reguladores osmóticos, manitol e sacarose (30, 60 e 90 g.L) e o ABA (0 e 5 μ M). Os embriões viáveis foram transferidos para meio de regeneração, contendo 1mg. L⁻¹ de BAP e GA₃. Os embriões somáticos que estavam em meio com 30g. L⁻¹, com ABA quando transferidos para meio de regeneração formaram plântulas saudáveis e vigorosas. O teste histoquímico azul de Evans e carmim acético confirmaram a natureza embriogênica do material. O estudo anatômico do processo de embriogênese somática em explantes foliares de cana-de-açúcar evidenciou o surgimento de calos embriogênicos a partir da epiderme, que em estágios mais avançados (embriões globulares) se desprendiam facilmente do explante. Era evidente a presença de uma protoderme bem definida, células isodiamétricas, com núcleo e nucléolo proeminentes e alta relação núcleo/citoplasma. Nos estágios posteriores foi possível observar uma estrutura apresentando meristema apical e basal bem definido, delimitada por uma protoderme e imersa em uma massa de células vacuolizadas, supondo ser um embrião somático em processo de formação. Ao final dos 30 dias em meio de maturação foi observada uma estrutura bipolar, constituída de ápices caulinar e radicular, que apresentava um sistema vascular fechado, sem conexão com os tecidos adjacentes, confirmando ser um embrião somático.

ABSTRACT

RAMOS, Rachel Soares, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Effect of growth regulators on somatic embryogenesis of sugarcane.** Adviser: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Co-Advisers: Luiz Alexandre Peternelli and Marília Contin Ventrella.

Somatic embryogenesis is the process of development of embryos from somatic cells. The aim of this study was to evaluate the efficiency of growth regulators at different stages of somatic embryogenesis of three cultivars of sugarcane, RB 867515, RB928064 e RB925345, and characterize the effects of *in vitro* treatments of the anatomical development of somatic embryos. Embryogenic calluses were obtained after inoculation of immature leaves arising from lateral buds on MS medium plus 30g.L sucrose, 2.5 g.L agar and different concentrations of 2,4-D, Dicamba and CPA (5,10,15 and 20 mM). After 30 days of induction it showed that the dose of 20 μ M 2, 4-D was the concentration that induced the highest percentage of callus, 36.95%, and callus were compact and whitish. The calluses were subcultured in the same medium for 30 days and after this period, the callus were transferred to medium with low concentration of 2,4-D (0.5 mg.L⁻¹) to obtain globular pro-embryos. The globular pro-embryos were transferred to multiplication medium and after 30 days were transferred to maturation medium. osmotic regulators were tested, mannitol and sucrose (30, 60 and 90 gL) and ABA (0 and 5 mM). The embryos were transferred to regeneration medium containing 1 mg. L⁻¹ BAP and GA3. The embryos that were in the medium with 30g. L⁻¹, with ABA when transferred to regeneration medium

formed healthy and vigorous plants. The histochemical Blue Evans test and Carmine Acetic confirmed the embryogenic of the material. The anatomical study of the process of somatic embryogenesis in leaf explants of sugar cane showed the emergence of callus from the epidermis, which in more advanced stages (globular embryos) easily detached from the explant. It was evident the presence of a well-defined protoderms, isodiametric cells with prominent nuclei and nucleoli and high nucleus / cytoplasm ratio. In the later stages were observed the basal and apical meristem well defined, bounded by a protoderm and immersed in a mass of vacuolated cells, assuming one is in the process of somatic embryo formation. At the end of 30 days in maturation, it was observed a bipolar structure, consisting of stem and root apices, which had a closed vascular system, without connection to the adjacent tissue, confirming the presence of the somatic embryo.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea, pertencente à família Poaceae, membro da tribo Adropogoneae e gênero *Saccharum* (Henry, 2010). É originária das regiões do Sudeste Asiático e da Nova Guiné (Daniels e Roach., 1987) e foi introduzida no Brasil por volta de 1553.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e o principal produtor mundial de açúcar e etanol, contribuindo com mais da metade do açúcar comercializado no mundo (MAPA, 2011).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra de 2009/2010 foi de 604 milhões de toneladas e a previsão para 2010/2011 será de 651 milhões de toneladas, variação de 7,80%.

A cana-de-açúcar é considerada um produto 100% aproveitável. A partir da fermentação do açúcar obtém-se o etanol, sendo este produto a principal alternativa aos combustíveis derivados de petróleo. Como subprodutos, a co-geração de energia elétrica, a partir da queima do bagaço, tem contribuído para que as usinas se tornem auto-suficientes do ponto de vista energético. Isto possibilita a utilização da cana-de-açúcar também como fonte de biomassa para a geração de energia elétrica, abastecendo cidades e indústrias.

A produção do etanol celulósico ou etanol de segunda geração, a partir do bagaço, tem sido objeto de estudo em nível mundial, o que permitirá o aumento da produção de etanol, sem a necessidade de aumento da área plantada (Demirbas, 2001).

Além desses, outros produtos como a vinhaça e a torta de filtro são compostos ricos em nutrientes, como fósforo, potássio, cálcio, magnésio e micronutrientes e podem ser usados como adubo (Ferrarezi e Vieira, 2009; Nardim, 2007).

A cana-de-açúcar é uma planta alógama e perene, de reprodução sexuada. Entretanto, a propagação por semente só é usada para fins de melhoramento genético. A propagação assexuada é a mais utilizada para plantios comerciais (Caieiro et al., 2010).

As variedades comerciais de cana-de-açúcar foram originadas de hibridações interespecíficas entre a espécie *Saccharum officinarum*, cana nobre e produtora de açúcar, e as espécies selvagens, *S. spontaneum*, *S. edule*, *S. barbieri* e *S. sinense* (Albino et al., 2006).

O melhoramento convencional é a principal forma de obtenção de novas variedades, entretanto, é um processo longo, variando entre 8 a 12 anos para a liberação de variedades comerciais. A biotecnologia tem auxiliado nos programas de melhoramento convencional, frente à crescente demanda por variedades mais produtivas, tolerantes a pragas e doenças e adaptadas às condições edafoclimáticas desfavoráveis. Os avanços nas áreas da cultura de tecidos, biologia molecular e engenharia genética, têm contribuído para a obtenção de plantas com características desejáveis, livres de pragas e doenças e adaptadas a essas novas áreas de produção agrícola.

A embriogênese somática em plantas merece destaque dentre as técnicas de cultura de tecidos. Esta rota morfogênica *in vitro* possibilita a multiplicação de genótipos superiores, além de sua importância para conservação de germoplasma e transformação de plantas (Zimmerman, 1993; Dudits et al., 1975; Guerra et al., 2001; Jimenez, 2001; Lakshmanan, 2005), produção de sementes sintéticas (Schultheis et al., 1990) e também pode ser utilizada para estudos básicos relacionados com o desenvolvimento do embrião (Yeung, 1999).

O embrião somático é morfológica e fisiologicamente similar ao zigótico, é caracterizado por uma estrutura bipolar, apresentando sistema vascular fechado, sem conexão com os tecidos adjacentes (Schumann et al., 1995; Williams e Maheswaran, 1986; Dodeman et al., 1997).

A morfogênese *in vitro* da cana-de-açúcar tem sido relatada em diversos trabalhos, utilizando diferentes variedades ou clones (Nadar et al., 1978; Ho e Vasil, 1983; Brisibe et al., 1994; Falco et al., 1996 (a e b); Rodríguez et al., 1997; Chengalrayan e Galo-Meagher, 2001; Gill et al., 2004; Gandonou et al., 2005; Nieves et al., 2008; Wang et al., 2008; Mittal et al., 2009). Estes autores identificaram a rota organogênica e/ou embriogênica nos referidos materiais em estudos, confirmando que a resposta morfogênica é genótipo-dependente. Por

isso, é de grande importância a realização de adaptações dos protocolos para cada cultivar a ser utilizada (Preece, 1995).

O presente trabalho tem como objetivos avaliar o efeito de reguladores de crescimento nas diferentes fases da embriogênese somática das cultivares RB867515, RB928064 e RB925345, e comprovar a embriogênese somática dos cultivares pela microscopia de luz.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cana-de-açúcar

Diante da atual situação mundial de esgotamento das fontes não-renováveis de energia, petróleo, carvão e gás natural torna-se de suma importância a busca por novas fontes energéticas (Miragaya, 2005). O Brasil possui diversas espécies vegetais que podem ser utilizadas para a produção de biocombustíveis. Dentre essas, a cana-de-açúcar destaca-se na produção de etanol, açúcar, energia e muitos outros subprodutos e responde por um faturamento anual da ordem de US\$ 23 bilhões (UNICA, 2010).

No Brasil, mais de 50% da área plantada com cana-de-açúcar contém as cultivares desenvolvidas pela Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA), formada por dez universidades federais, da qual a Universidade Federal de Viçosa faz parte.

As cultivares RB867515, RB928064 foram desenvolvidas pelo Departamento de Fitotecnia da UFV e estão protegidas junto ao Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC). Estas são destaque em produtividade de açúcar e tolerante às principais doenças de importância em nosso país. A RB867515 foi a cultivar mais plantada no Brasil nas últimas duas safras, com plantio estimado de 20% do total. Esta cultivar tem sido a melhor opção para manejo em solos de baixa fertilidade, de textura arenosa e com restrições hídricas (RIDESA, 2010).

A cultivar RB925345 foi desenvolvida pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e apresenta alto teor de sacarose, alta produtividade e alto teor de fibra no início de

safra, além de um desenvolvimento rápido e bom fechamento da entrelinha, com ampla adaptabilidade e boa estabilidade, entretanto esta variedade é susceptível ao carvão.

2.2. Embriogênese somática

A morfogênese de células e tecidos das plantas pode se iniciar pelas vias organogênicas ou embriogênicas (Bakos et al., 2000).

A embriogênese somática é uma técnica de cultura de tecidos em que células haplóides ou diplóides desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos. Ocorre uma sequência ordenada de estádios embriogênicos, entretanto sem a fusão de gametas (Guerra et al., 1999; Jimenez, 2001).

Na embriogênese zigótica, nos primeiros estágios de desenvolvimento, os embriões zigóticos das dicotiledôneas e monocotiledôneas passam por uma sequência de divisões celulares semelhantes, que resultam em estruturas globulares.

Posteriormente a esta fase, o embrião das dicotiledôneas desenvolve dois cotilédones em posição lateral (tornando-se aproximadamente cordiforme), enquanto o embrião das monocotiledôneas permanece cilíndrico, formando apenas um cotilédone. O meristema apical caulinar em dicotiledôneas se encontra entre os dois cotilédones, enquanto nas monocotiledôneas ocupa uma posição apical (Beltrati, et al., 2006).

Dentre os embriões das monocotiledôneas, o das Poaceae é o mais peculiar. Apresenta um embrião indiferenciado na semente madura, que ocupa posição lateral e periférica ao endosperma (GPWG, 2001). Possui um cotilédone maciço, o escutelo, estreitamente aderente ao endosperma. Nas espécies pertencentes à família Poaceae a coleorriza é uma bainha de tecido envolvendo a região inferior da radícula. O coleóptilo é uma bainha cotiledonar modificada e fechada, na qual, no interior, se encontra a plúmula (Beltrati et al., 2006).

Os embriões somáticos e zigóticos são diferentes em alguns aspectos: os embriões somáticos se desenvolvem livres de correlações físicas, fisiológicas e genéticas com os tecidos maternos, ao contrário do que ocorrem durante o desenvolvimento de um embrião zigótico (Zimmermann, 1993) e os embriões somáticos podem apresentar desenvolvimento

anormal, sendo que uma particularidade dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (Guerra et al., 1999).

A embriogênese somática tem se mostrado importante para a micropropagação de plantas elite em larga escala. Tem contribuído para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do embrião (Yeung, 1995) e para produção de plantas transgênicas e de sementes sintéticas (Schultheis et al., 1990).

As técnicas de micropropagação e regeneração *in vitro* têm sido utilizadas para a propagação comercial de cultivares de cana-de-açúcar em vários países (Lakshmanan, 2006). O desenvolvimento de sistemas automatizados, como os bioreatores, tem contribuído para a propagação em larga escala e na redução dos custos (Walker et al., 1991; Wang et al., 1998; 1999; Lorenzo et al., 2001).

A embriogênese somática se diferencia da micropropagação, via ápices caulinares e da organogênese, pois nos embriões somáticos observa-se a presença de um sistema vascular fechado (Schumann et al., 1995; Guerra et al., 1999), e independentes do explante que lhe deu origem (Guerra et al., 1999). Os ápices ou as gemas adventícias são estruturas unipolares (Schultheis et al., 1990), com conexão vascular com o tecido do explante (Haccius, 1978).

O processo de embriogênese somática pode ser dividido em quatro fases distintas: a indução, multiplicação, maturação e germinação (Tautorus et al., 1991; Weber et al. 1997).

As células somáticas, em sua maioria, não são embriogênicas e a fase da indução é requerida para a aquisição da competência embriogênica (Dodeman et al., 1997).

As etapas iniciais da embriogênese somática são consideradas críticas, pois nesta fase são estabelecidos a polaridade, a camada protodérmica e os demais meristemas (Bozhkov et al., 2002). Além disso, a frequência de indução depende das condições de cultivo e dos tecidos utilizados (Chen et al., 1988; Snyman et al., 2006); do genótipo, do estágio de desenvolvimento do explante (Carman, 1990), e também dos níveis hormonais endógenos no explante (Jimenez, 2001).

De acordo com Laksmanan (2006) os calos de cana-de-açúcar podem apresentar três tipos morfológicos, e essas diferenças morfológicas podem influenciar o potencial morfogênico dos calos.

O calo embriogênico tem aspecto duro e compacto, com uma coloração amarelada. Os calos não-embriogênicos tem aspecto friável, mucilaginoso, é macio e tem uma coloração translúcida e brilhante.

A maturação é a fase em que o embrião sofre várias mudanças morfológicas e bioquímicas, ocorrendo a redução do conteúdo de água e a acumulação de reservas nos embriões somáticos. A germinação é paralisada e o embrião adquire a tolerância à dessecação. É nesta fase que os tecidos ou as células induzidas expressam as suas competências, diferenciando-se em embriões somáticos (Ammirato, 1986).

O ABA (Ácido Abscísico) é o regulador mais utilizado na fase de maturação. Este regulador de crescimento contribui diretamente na prevenção da germinação e na tolerância à dessecação. A sua adição ao meio melhora a formação e maturação dos embriões somáticos (Guerra et al., 1999).

Os carboidratos também aparecem como fator determinante na capacidade de indução de embriogênese somática. Kochba et al. (1982), verificaram que a embriogênese somática é um processo crítico na regeneração de plantas e por essa razão deveria ser otimizada especialmente em relação à fonte de carbono adicionada ao meio de cultura.

Por isso, a suplementação do meio de cultivo com carboidratos, como a sacarose (Ho e Vasil, 1983; Brisibe et al., 1983); sorbitol e manitol (Brisibe et al., 1993; Yang et al., 2009), contribuem para evitar a germinação precoce e o desenvolvimento anormal dos embriões somáticos (Ammirato et al., 1971). Estes compostos ajudam a aumentar a osmolaridade das células e este processo contribui para a transição do ciclo divisão/diferenciação (Guerra et al., 1999).

Morris et al. (1988) utilizaram 30 gL⁻¹ de sacarose e 90 gL⁻¹ de manitol, com o objetivo de verificar a relação entre o manitol e o acúmulo endógeno de ABA em embriões zigóticos de aveia e trigo e observaram um pequeno aumento no teor de ABA em embriões de trigo e um alto teor de ABA em embriões de aveia, contribuindo para o controle de desenvolvimento do embrião e a germinação precoce *in vitro*.

A conversão em plantas é a fase final do processo de embriogênese somática. Após a maturação os embriões são transferidos para meio de cultura com baixa concentração de auxinas ou desprovidos desses reguladores (Ahloowalia and Maretzki, 1983). Também pode

ser acrescentado citocininas ou GA₃ ao meio de cultura, para conversão dos embriões em plântulas.

Em cana-de-açúcar, a regeneração tem sido obtida utilizando-se diversas citocininas combinadas ou não com auxinas. Chengarayan e Gallo-Meagher (2001) utilizaram cinco diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10µM) de citocininas (BA, Cinetina, 2iP, Zeatina e TDZ) e concluíram que 2,5µM de TDZ era suficiente para a formação de plantas de cana-de-açúcar, da cultivar CP84-1198.

Irvine e Benda (1987) utilizaram 9,3µM de Cinetina e 22,3µM de ANA e obtiveram plântulas de cana-de-açúcar.

É imprescindível conhecer os processos de indução, diferenciação e competência celular, bem como entender como ocorre o crescimento dos tecidos e das células em cultura, para que uma vez compreendidos estes processos, a técnica possa ser eficazmente aplicada.

A embriogênese somática é caracterizada por dois padrões básicos de diferenciação, a direta e a indireta. Na embriogênese direta, os embriões se originam diretamente dos explantes iniciais, sem passar pelos estágios de calos, requerendo somente reguladores de crescimento ou condições favoráveis para o início da divisão celular e posterior expressão embriogênica (Williams et al., 1986).

Desai et al, 2004 obtiveram embriogênese somática direta utilizando como explantes inflorescências de cana-de-açúcar. Discos foliares foram utilizados para obter embriogênese somática direta e estes embriões foram empregados em trabalhos de transformação genética de cana-de-açúcar (Snyman et al., 2000).

Na embriogênese indireta é necessária a predeterminação das células diferenciadas, com a proliferação dos calos e o posterior desenvolvimento do estado embriogênico (Williams e Maheswaran, 1986; Schultheis et al., 1990). Os calos apresentam células em diferentes estádios de diferenciação e, por isso, com diferentes graus de determinação, e desta maneira, podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (Sharp, 1980).

De acordo com Gattapaglia et al., (1998) a grande maioria dos sistemas de embriogênese somática ocorre pelo modo indireto. Em cana-de-açúcar diversos autores têm relatado a ocorrência da embriogênese somática indireta (Gill et al., 2004; Garcia et al., 2007; Mittal et al., 2009).

As auxinas e as citocininas são os reguladores de crescimento envolvidos no processo de divisão celular e de diferenciação dos tecidos vegetais (Fehér et al., 2003). Em várias espécies, o explante é cultivado em meio com alta concentração de auxinas até a formação de agregados embriogênicos e posteriormente, para a formação dos embriões, é feita a transferência destes agregados para meio suplementado com baixa concentração da auxina ou desprovido desta (Guerra et al., 1999; Ho e Vasil, 1983).

Diversas auxinas têm sido utilizadas para a indução. Dentre elas destacam-se o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), Dicamba (ácido 3,6-dicloroanísico), ANA (ácido naftalenoacético), Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), CPA (ácido 2,4,5-clorofenoxiacético). Estas substâncias desempenham papel importante na fase de indução, pois são eficientes na expressão da desdiferenciação e rediferenciação das células dos explantes e, por essa razão, tem sido utilizada para a indução de várias espécies vegetais (Zimmerman, 1993; Fehér et al., 2003).

O 2,4-D tem se mostrado a auxina mais eficiente na indução de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (Ho e Vasil 1983; Ahloowalia and Maretzki, 1983; Chen et al., 1988; Fitch and Moore, 1990; Liu, 1993; Oropeza and Garcia, 1996; Gallo-Meagher et al., 2000; Chengalrayan and Gallo-Meagher, 2001)). Entretanto, outras auxinas têm sido utilizadas com sucesso para indução e formação de embriões somáticos cana-de-açúcar. Brisibe et al. (1994) utilizaram 30µM de Dicamba e conseguiram embriões viáveis após 40 meses. Watt et al (2009) manteve embriões somáticos de cana-de-açúcar por mais de 12 semanas estocados em meio ½ MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de 5g.L⁻¹ de sacarose, à temperatura de 18°C a 24°C e após esse período os embriões permaneceram viáveis. Garcia et al (2007) utilizaram Picloram, ANA e 2,4-D e observaram a presença de organogênese direta quando utilizaram ANA e a presença de embriões quando utilizaram o Picloram e 2,4-D.

Protocolos de embriogênese somática já foram descritos para inúmeras variedades de cana-de-açúcar, utilizando diferentes tipos de explantes, como folhas jovens (Ho e Vasil, 1983; Ahloowalia e Maretzki, 1983; Chen et al., 1988; Brisibe et al., 1994), inflorescência imatura (Liu, 1993; Blanco et al., 1997), ápices caulinares (Ahloowalia e Maretzki, 1983). Entretanto, a utilização de explantes advindos de gemas laterais tem sido pouco relatada na literatura, portanto, a utilização dessa fonte de explante pode ser uma alternativa para

viabilizar a indução, a formação de embriões somáticos saudáveis e viabilizar a regeneração de plântulas.

As células meristemáticas caracterizam-se por intenso processo de divisão, tamanho reduzido das células, citoplasma denso, núcleo grande com nucléolos proeminentes, pequenos vacúolos e uma profusão de grãos de amido. As propriedades histoquímica e ultra-estruturais sugerem uma intensa síntese de RNA e atividades metabólicas (Williams e Maheswaran, 1986).

As análises anatômicas são uma ferramenta importante nos eventos de cultivo *in vitro*, pois permitem a caracterização e identificação dos processos morfogênicos. Duas vias de morfogênese *in vitro* podem ocorrer, a organogênese e a embriogênese somática. Estas rotas morfogênicas podem ser distinguidas através de diferenças anatômicas existentes entre os embriões somáticos e as gemas adventícias.

A caracterização anatômica do processo de morfogênese em cana-de-açúcar tem sido relatada em diversos trabalhos (Nadar et al., 1978; Ho e Vasil., 1983 a e b; Brisibe et al., 1994; Rodríguez et al., 1997; Falco et al., 1996; Garcia et al., 2007).

Entretanto, a resposta embriogênica é considerada genótipo-dependente (Gandonou et al., 2005) e a capacidade de proliferação de calos embriogênicos em cana-de-açúcar é fortemente influenciada pelo genótipo (Cidade et al., 2006; Lakshmana, 2006), por isso, adaptações aos protocolos de embriogênese somática se fazem necessários, principalmente para cultivares nacionais de grande importância econômica, como as variedades RB867515, RB928064 e RB925345. O acompanhamento das alterações ocorridas nos explantes durante a indução, maturação e germinação, de acordo com os tratamentos aplicados no presente trabalho mostra-se de grande importância para a caracterização e interpretação do processo morfogênico e dessa maneira potencializar os processos de transformação de cana-de-açúcar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Plantas das cultivares RB867515, RB928064 e RB925345 de aproximadamente 10 meses de idade foram coletadas no Centro de Pesquisa e Melhoramento da Cana-de-açúcar (CECA), localizado em Oratórios, MG, latitude 20°25' S, longitude de 42°48' W e a 494 m de altitude.

No momento da coleta foram retirados os ápices e coletados seis nós na região mediana do colmo.

3.1. Desinfestação do material

Colmos de cana-de-açúcar foram cortados em segmentos nodais de aproximadamente 6,0 cm e armazenados em estufa incubadora BOD (Diurnal Growth Chambers, Forma Scientific, USA), à temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, para desenvolvimento das gemas e brotações. Após 20 dias de incubação, foi feita a seleção das gemas laterais mais desenvolvidas e vigorosas. As brotações de aproximadamente 7,0 cm (Figura 1 A) foram lavadas com detergente Detertec[®] 50% (Vertec), por 10 minutos e enxaguadas em água corrente. Em seguida foi feita a retirada das folhas externas e estas mergulhadas em solução fungicida de agrimaissim 500 por 20 minutos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio Candura (2,0 a 2,5% de cloro ativo) diluída em água deionizada na

concentração 1:1 por 20 minutos. As folhas internas (Figura 1B) foram levadas para câmara de fluxo laminar onde foram submetidas à desinfestação através da imersão em álcool 70% por 1 minuto, seguido de imersão em bicloreto de mercúrio por 20 minutos e em seguida imersão em hipoclorito de sódio por 20 minutos, acrescidos de 3 gotas do surfactante tween-20[®]. Após cada etapa de desinfestação as brotações foram enxaguadas em água deionizada autoclavada por três vezes.

3.2. Indução da embriogênese somática

Os explantes foram seccionados em segmentos de 0,5 cm de comprimento e inoculados em placas de Petri estéreis de poliestireno de 60x15mm (JProlab) (Figura 1C), contendo 30 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 30 gL⁻¹ de sacarose, vitaminas MS, 100 mgL⁻¹ mio-inositol, 100 mgL⁻¹ de ácido cítrico, 25 mgL⁻¹ ácido ascórbico, 100 mgL⁻¹ Polivinilpirrolidona (PVP), e 2,5 gL⁻¹ Gelrite[®] (Sigma, USA) para solidificação. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos em frascos Erlenmeyers de 500 mL e vertidos nas placas em câmara de fluxo laminar.

O experimento foi instalado no delineamento em blocos casualizados (DBC), segundo o esquema fatorial 3x4. Os tratamentos consistiram da combinação de 3 reguladores de crescimento (2,4-D, Dicamba e CPA) e 4 concentrações (5, 10, 15 e 20 µM) mais controle (MS sem adição de reguladores de crescimento). Os blocos consistiram em três dias em que os experimentos foram realizados.

Foram utilizadas seis placas, sendo colocados cinco explantes/placa (Figura 1C). As placas foram incubadas no escuro, em sala de cultura mantida a 27°C ± 2°C por 30 dias. Após esse período de indução foi feita a quantificação de calos por placa, a avaliação da coloração e morfologia (Figura 1D). Os dados foram submetidos à análise de variância e foram realizadas as análises do resíduo para verificação das pressuposições da ANOVA. Os efeitos da dose foram ajustados ao modelo de regressão. A comparação das médias dos reguladores foi realizada por meio teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os calos embriogênicos foram recultivados em novo meio, contendo a mesma concentração de reguladores de crescimento utilizada anteriormente. Os calos embriogênicos que melhor se desenvolveram, após 30 dias, foram transferidos para meio de cultura com baixa concentração de 2,4-D ($2,26\mu\text{M}$) para indução dos embriões somáticos, permanecendo neste meio por mais 30 dias.

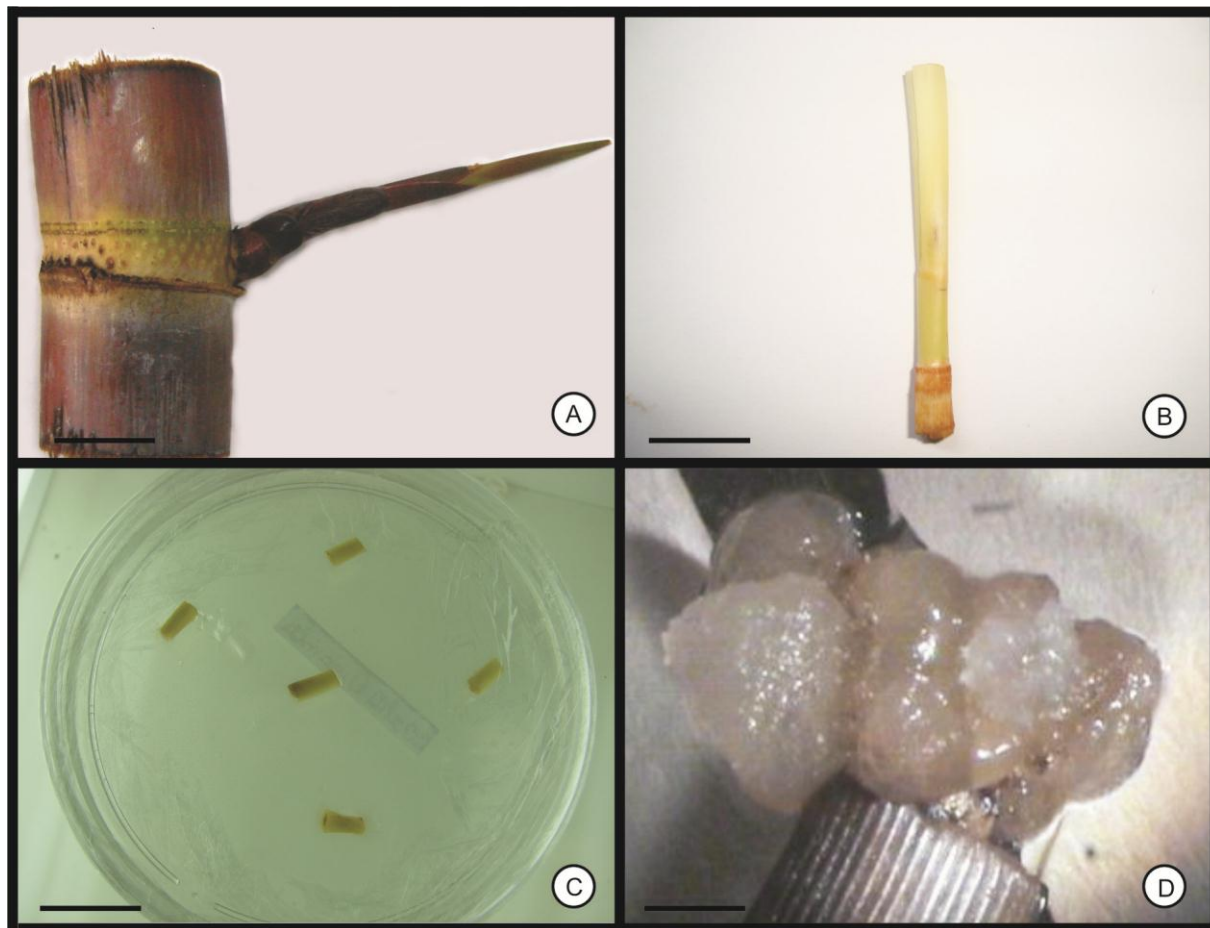


Figura 1: Preparo do explante para a inoculação. A: Tolete de cana-de-açúcar com a gema desenvolvida, medindo aproximadamente 7,0 cm. B: Gema lateral sem as folhas externas. C: Segmentos de explantes foliares plantados em meio de indução. D: Calos embriogênicos desenvolvidos em meio de indução. Barra: A=B=C=D=1 cm.

3.3. Multiplicação dos calos embriogênicos

Os calos embriogênicos das variedades RB867515 e RB928064, provenientes do meio de cultura com $2,26\mu\text{M}$ de 2,4-D foram subcultivados aleatoriamente em meios de

multiplicação em placas de Petri de poliestireno com 90x15 mm, contendo 30 mL de meio de cultura MS, adicionado de 2,26 μM de 2,4-D. Neste experimento foram testadas três doses de Ácido Indol Acético (AIA), nas concentrações de 6, 12 e 24 $\mu\text{L/placa}$. O delineamento adotado foi em blocos casualizados, com quatro blocos. Os blocos consistiram nas quatro épocas em que foram feitos os subcutivos em meio de multiplicação. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri com cinco calos, com tamanho inicial de aproximadamente 0.71 cm^2 .

As placas foram mantidas no escuro a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias. Nesse período a área dos calos embriogênicos foi avaliada a cada cinco dias em papel milimetrado.

3.4. Maturação dos embriões somáticos

Calos embriogênicos utilizados nesta fase tiveram origem do experimento da multiplicação. Foram utilizados calos embriogênicos advindos do tratamento com 24 μL de AIA.

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com duas fontes de carbono, sacarose e manitol, sendo três doses, 30, 60 e 90 g L^{-1} e Ácido Abscísico (ABA) em duas concentrações, 0 e $5\mu\text{M}$ e seis repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri com oito calos embriogênicos.

Após a inoculação, as placas de Petri foram mantidas no escuro por dois dias e posteriormente transferidas para sala de cultivo, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas escuro, sendo a irrâdiancia de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida com lâmpadas fluorescentes de 40W Osram® e temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 20 dias. Após esse período, avaliou-se a presença de embriões somáticos e o número de explantes necrosados.

3.5. Germinação dos embriões somáticos

Embriões somáticos maduros foram transferidos para placas contendo meio de cultura MS acrescido de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP e $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 . As placas foram mantidas no escuro por dois dias e após esse período foram transferidas para sala de cultivo, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, obtida com lâmpadas fluorescentes de 40 W Osram® e temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ até o desenvolvimento da parte aérea.

Os embriões que formaram plantas foram transferidos para frascos, contendo o mesmo meio de cultura MS, acrescido de 1 mgL^{-1} de BAP + 1 mgL^{-1} de GA_3 e $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA.

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com as duas fontes de carbono, sacarose e manitol, sendo três doses, 30, 60 e 90 gL^{-1} e Ácido Abscísico (ABA) em duas concentrações, 0 e $5 \mu\text{M}$ e seis repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri com oito calos embriogênicos.

O número de plântulas formadas, advindas dos embriões somáticos maduros do experimento de maturação foi avaliado.

As etapas do processo de embriogênese somática estão esquematizados na figura 2.

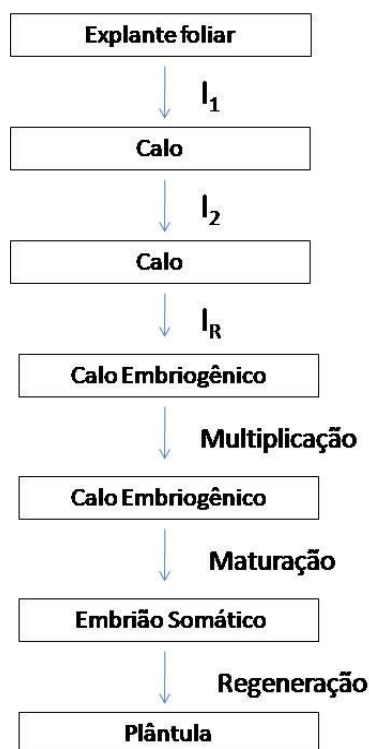


Figura 2. Esquema representativo dos experimentos realizados em explantes foliares de cana-de-açúcar. I₁: Primeira indução. I₂: Recultivo em mesmo meio de indução. I_r: Transferência para meio com concentração reduzida de 2,4-D.

3.6. Microscopia de luz

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Para a caracterização anatômica do processo de embriogênese somática a partir de tecidos foliares, foram coletados três explantes por tratamento em intervalos de 0, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 60 e 90 dias de cultivo em meio para indução. Também foram coletados embriões somáticos em meio de maturação e germinação.

Foram realizados o teste do azul de Evans e carmim acético (Durzan, 1988) em calos embriogênicos para confirmação da presença de células embriogênicas na massa de calos.

Foram coletadas cariopses e as sementes retiradas com a ajuda do esterioscópio de luz.

As amostras e as sementes coletadas foram fixadas em FAA₅₀ (formaldeído, ácido acético e etanol 50%) durante 48 horas sob vácuo e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). As amostras foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica). Os blocos foram cortados transversal e longitudinalmente em secções de 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica RM 2155-UK). Os cortes foram corados com azul de toluidina para metacromasia (O'Brien et al., 1964) e as lâminas montadas em resina sintética (Permout).

As observações e documentações foram feitas em fotomicroscópio (Olympus AX70) equipado com sistema U-photo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desinfestação do material

Foi observado baixo nível de contaminação por microorganismos, demonstrando que a metodologia utilizada foi eficiente para a desinfestação dos explantes.

4.2. Indução da embriogênese somática

Não houve diferença significativa entre as variedades com relação ao número de calos embriogênicos formados. Entretanto, a indução foi influenciada pelos reguladores de crescimento. Houve interação significativa pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. Com relação às doses, houve diferença significativa e estas foram ajustadas ao modelo de regressão ($P < 0,05$).

A porcentagem de indução de calos aumentou linearmente com o aumento da dose, para todos os reguladores (Figura 3).

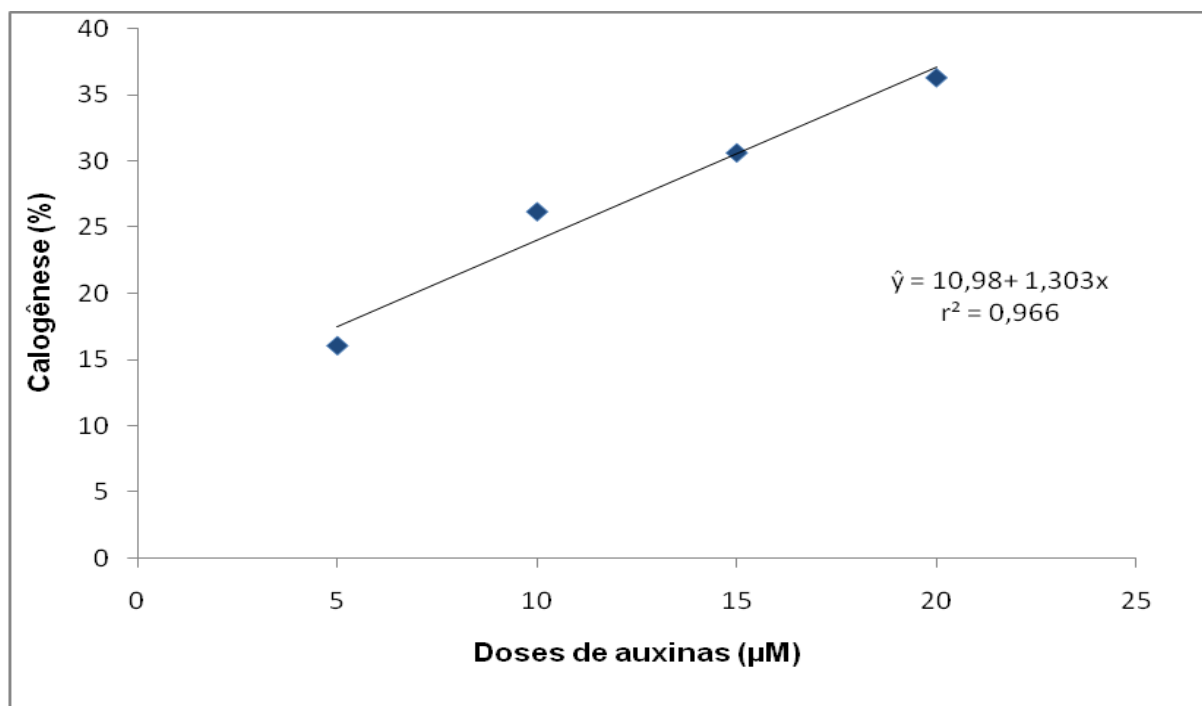


Figura 3. Estimativa da porcentagem de indução de calos em explantes foliares de três variedades de cana-de-açúcar, aos 30 dias após indução, em meio MS, suplementado com concentrações (5, 10, 15 e 20 µM) de três auxinas (2,4-D, dicamba e CPA).

A formação de calos iniciou-se aos 5 dias após inoculação dos explantes, sendo que aos 30 dias após indução, foi feita a quantificação de calos formados por explante, observação da coloração e morfologia. Foram obtidos calos em todos os tratamentos, para todas as três variedades testadas, exceto no tratamento controle. A variedade RB925345 apresentou baixa porcentagem de formação de calos e estes apresentavam-se mucilaginosos e translúcidos, dessa maneira os calos desta variedade não foram utilizados nas fases posteriores.

No mesmo explante era possível encontrar calos nodulares, de coloração esbranquiçada/amarelada, característicos calos embriogênicos, e calos macios, translúcidos ou mucilaginosos, sendo provavelmente calos não embriogênicos.

Ho e Vasil (1983a) trabalhando com folhas imaturas de cana-de-açúcar, também obtiveram calos com variado potencial morfogênico, como calos compactos, que em estágios tardios se mostraram embriogênicos, calos friáveis e translúcidos e calos mucilaginosos, não embriogênicos. Aftab et al. (1996) observaram o desenvolvimento de calos embriogênicos e não embriogênicos no mesmo explante.

Em todas as doses de CPA foi observado pouco calejamento (15%) e o desenvolvimento de parte aérea, sem passar pelos estágios de calos e muitos explantes necrosados. Moura (2007) observou menores índices de indução de calos embriogênicos, quando embriões zigóticos de *Acrocomia aculeata* foram inoculados em meio acrescido com CPA. Entretanto, Moura e Motoike (2009), observaram que 0,5 mgL⁻¹ de CPA foi suficiente para a formação de embriões somáticos, sem a formação de calos embriogênicos em sementes imaturas de goiabeira.

Nos tratamentos com Dicamba ocorreram pouco calejamento. Estes calos tinham aparência mucilaginosa e presença de raízes, principalmente na dose de 5 µM.

Brisibe et al. (1994) utilizaram segmentos foliares de cana-de-açúcar já estabelecidos in vitro e testaram diferentes auxinas, sendo o Dicamba, na dose de 30 µM, a auxina que proporcionou melhores respostas com relação à manutenção da competência embriogênica por longo período.

Neibaur et al. (2008) trabalhando com inflorescências imaturas da gramínea *Paspalum vaginatum* Swartz, , observaram que, após 21 dias de cultivo em meio de indução, a porcentagem de calos formados em meio contendo 15µM de 2,4-D foi maior (54,4%) em relação à porcentagem de calos formados em meio contendo mesma concentração de Dicamba (42,3%). Entretanto, explantes em meio com Dicamba apresentaram maior peso médio (97mg/ inflorescência), em relação a 2,4-D, que produziu 40 mg/inflorescência.

Todavia, no presente trabalho foram obtidos maiores porcentagens de calos embriogênicos quando foi utilizado o 2,4-D (36,95%), enquanto, nos tratamentos utilizando o Dicamba, foram obtidos 29,26% de calos embriogênicos, para as três variedades testadas.

Carman (1988) comparando o efeito de diferentes auxinas no processo de embriogênese somática em trigo propôs que o dicamba poderia ser um agente potente para aumentar a frequência de calos embriogênicos, talvez devido à facilidade de ser metabolizado pelas células das gramíneas.

No presente trabalho, foram observados que os explantes mantidos nos tratamentos com 20µM de 2,4-D formavam maior quantidade de calos em relação aos outros tratamentos. Estes calos apresentavam-se com aspecto mais firme e compacto, de coloração amarelada a creme. Também foram observados muitos calos de aspecto translúcido, provavelmente calos embriogênicos e não-embriogênicos no mesmo explante, porém havia mais calos

embriogênicos do que não embriogênicos. Nos tratamentos com 5 μ M de 2,4-D foram observados pouco calejamento. Estes tinham coloração esbranquiçada translúcida, característica de calos não-embriogênicos. Os calos apresentaram muitas raízes. Nos tratamentos com 10 e 15 μ M de 2,4-D os calos formados apresentavam-se com coloração de branco a creme, entretanto não apresentavam aspecto de calos embriogênicos.

O 2,4-D tem sido a principal auxina utilizada na indução e manutenção da embriogênese somática em monocotiledôneas (Dudits et al., 1975) e em gramíneas (Ho e Vasil., 1983a; Poeaim et al., 2005; Vega et al., 2009; Campos et al., 2009; Jha et al., 2009).

Em cana-de-açúcar, vários trabalhos têm demonstrado que o 2,4-D é a auxina mais potente para a indução de calos embriogênicos (Macedo, 2010). O 2,4-D é metabolizado rapidamente, o que leva ao espessamento das paredes celulares e à diferenciação irreversível em embriões somáticos (Vasil, 1983).

Segundo Ahloowalia et al. (1983), é importante a remoção ou redução de 2,4-D do meio de cultura para que ocorra a formação de plântulas normais e sadias. No presente trabalho, os calos foram subcultivados em meio de cultura com reduzida concentração de 2,4-D (2,26 μ M) e foi observado o desenvolvimento de calos embriogênicos.

Dodeman et al. (1997) relataram que uma estratégia usual para induzir a embriogênese em cenoura, em suspensão, consiste em expor os explantes à alta concentração de auxinas e depois transferi-los para meio sem auxinas, o qual desencadeia a formação de embriões somáticos. Ho e Vasil. (1983), afirmam que baixa concentração de 2,4-D (2,26 μ M), é suficiente para a produção de calos embriogênicos em cana-de-açúcar. Entretanto, Nadar et al. (1978), sugerem que para o processo de desdiferenciação e a iniciação da embriogênese é necessário alta concentração de auxinas.

4.3. Multiplicação dos calos embriogênicos

Em função da baixa resposta em relação à indução de calos embriogênicos da variedade RB925345, foram utilizados nas fases posteriores apenas calos oriundos das variedades RB867515 e RB928064.

Aos 30 dias em meio de multiplicação, foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) entre as variedades estudadas com relação ao crescimento e desenvolvimento dos calos embriogênicos ao longo do tempo (Figura 4). Utilizou-se a análise de variância e os efeitos da interação variedade x tempo foram ajustados ao modelo de regressão.

Não houve efeito significativo entre as doses de AIA testadas ($P < 0,05$). Foi observado escurecimento em porções das massas pró-embriogênicas.

Durante o processo embriogênico, o AIA é importante nos eventos de diferenciação e no estabelecimento da simetria bilateral dos embriões (Fischer et al., 1996; Kong et al., 1997).

De acordo com Dudits et al. (1995), o 2,4-D atua diretamente através de um aumento nos níveis endógenos do AIA e alterando o metabolismo das auxinas, o que pode contribuir para a multiplicação dos calos embriogênicos.

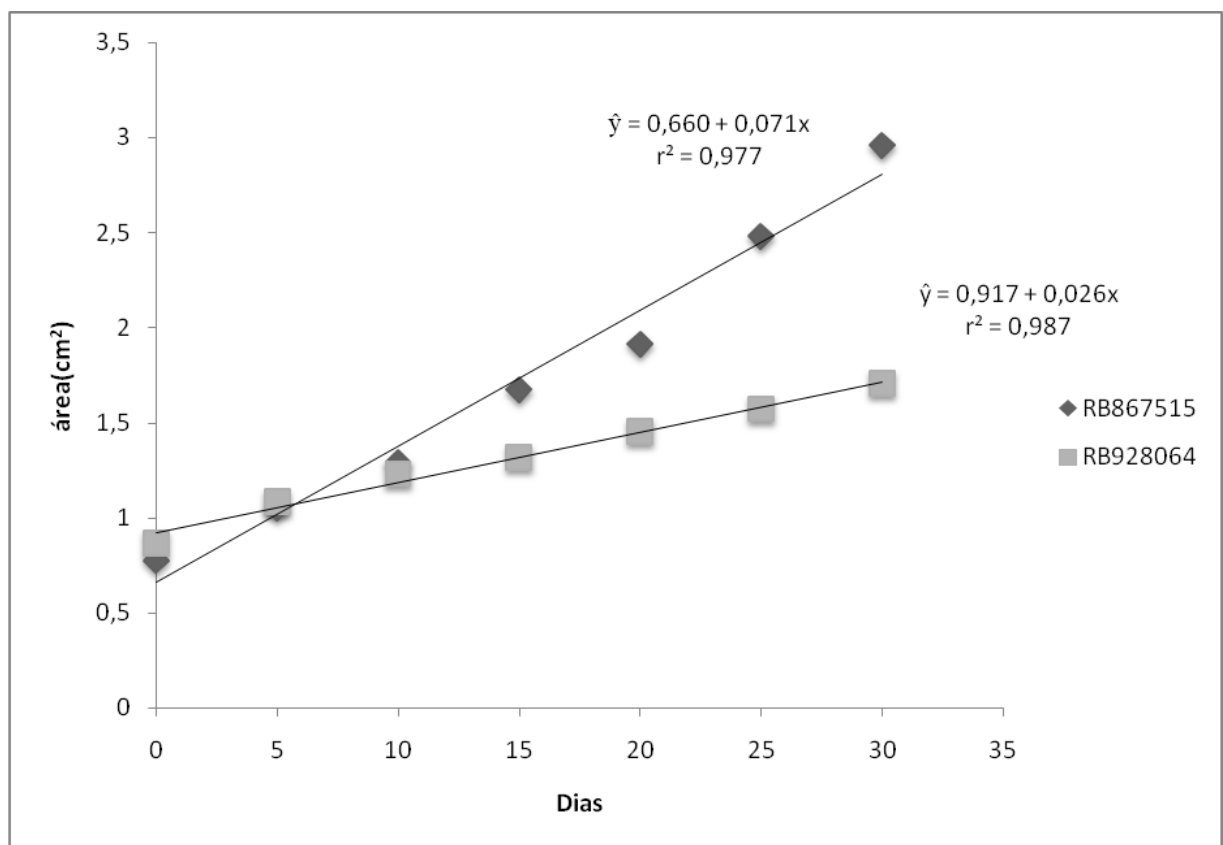


Figura 4. Crescimento de calos embriogênicos das variedades RB867515 e RB928064, durante 30 dias.

4.4. Maturação das massas pró-embriogênicas

No presente trabalho verificou-se diferença significativa ($P < 0,05$) somente entre os reguladores osmóticos, sacarose e manitol, com relação à necrose.

Os embriões somáticos obtidos em meio de multiplicação foram transferidos para meio de maturação, de acordo com os tratamentos e permaneceram neste meio por 20 dias, sob luz.

Brisibe et al. (1994) observaram que culturas embriogênicas, quando transferidas para meio com 5 μM de ABA, e mantidas por 14 dias, no escuro, apresentaram maior frequência de embriões somáticos.

Na maioria dos tratamentos com manitol os embriões se mantiveram com uma coloração esbranquiçada por todo período que estavam em meio de maturação, nas duas variedades. Foi obtido um número médio de 11 explantes necrosados.

Na concentração de 30 g L^{-1} de manitol sem ABA, foram observadas partes esverdeadas (Figura 5A) e no tratamento com ABA as massas pró-embriogênicas apresentaram um escurecimento em uma porção do explante (Figura 5B). Entretanto, quando estes explantes foram transferidos para meio de regeneração não foi observada a germinação.

Nos tratamentos com 60 g L^{-1} de manitol sem ABA foi observado necrose em parte do explante (Figura 5C) e estes paralisaram o crescimento, e nos tratamentos com ABA os embriões permaneceram com uma coloração esbranquiçada (Figura 5D). De acordo com Gill et al. (2003), o crescimento é inversamente proporcional à quantidade de necrose que ocorre no explante, pois a necrose dificulta a absorção de nutrientes e nessa maneira reduz o crescimento.

Nos tratamentos com 90 g L^{-1} de manitol, tanto nos tratamentos com ou sem ABA não foi observada necrose e os calos tinham uma coloração esbranquiçada (Figura 5E e 5F).

Resultados semelhantes foram obtidos por Yang et al. (2009), que utilizaram manitol em várias concentrações e verificaram que concentrações acima de 3% foram prejudiciais e suprimiam a embriogênese somática em soja. Segundo esses autores, a supressão da embriogênese somática pode ter ocorrido devido à pressão osmótica em excesso sofrida pela célula, e que, a alta concentração de manitol causa um decréscimo na embriogênese somática.

O aumento da osmolaridade pode ser obtido pela adição ao meio de reguladores osmóticos, como o manitol, com valores de 200 a 350 mM (Guerra et al., 1999).

Segundo Ammirato et al. (1971) o manitol atua reduzindo o potencial de água nas células dos embriões. Este composto previne a germinação precoce e o desenvolvimento anormal dos embriões somáticos em cultura de cenoura. Entretanto, segundo Samoylov et al. (1998) o manitol pode ser considerado uma fonte de carboidrato e como tal não é prejudicial à célula.

Brisibe et al. (1993) testaram diversos carboidratos, em um experimento com calos embriogênicos de cana-de-açúcar e observaram que maltose, na concentração de 6% e o xarope de milho na concentração de 6 a 9% proporcionaram as mais altas frequências de calos embriogênicos e embriões somáticos. Segundo estes autores a sacarose provocou a formação de embriões morfologicamente mal formados, com escutelo fusionado e coleptilo com alongamento anormal.

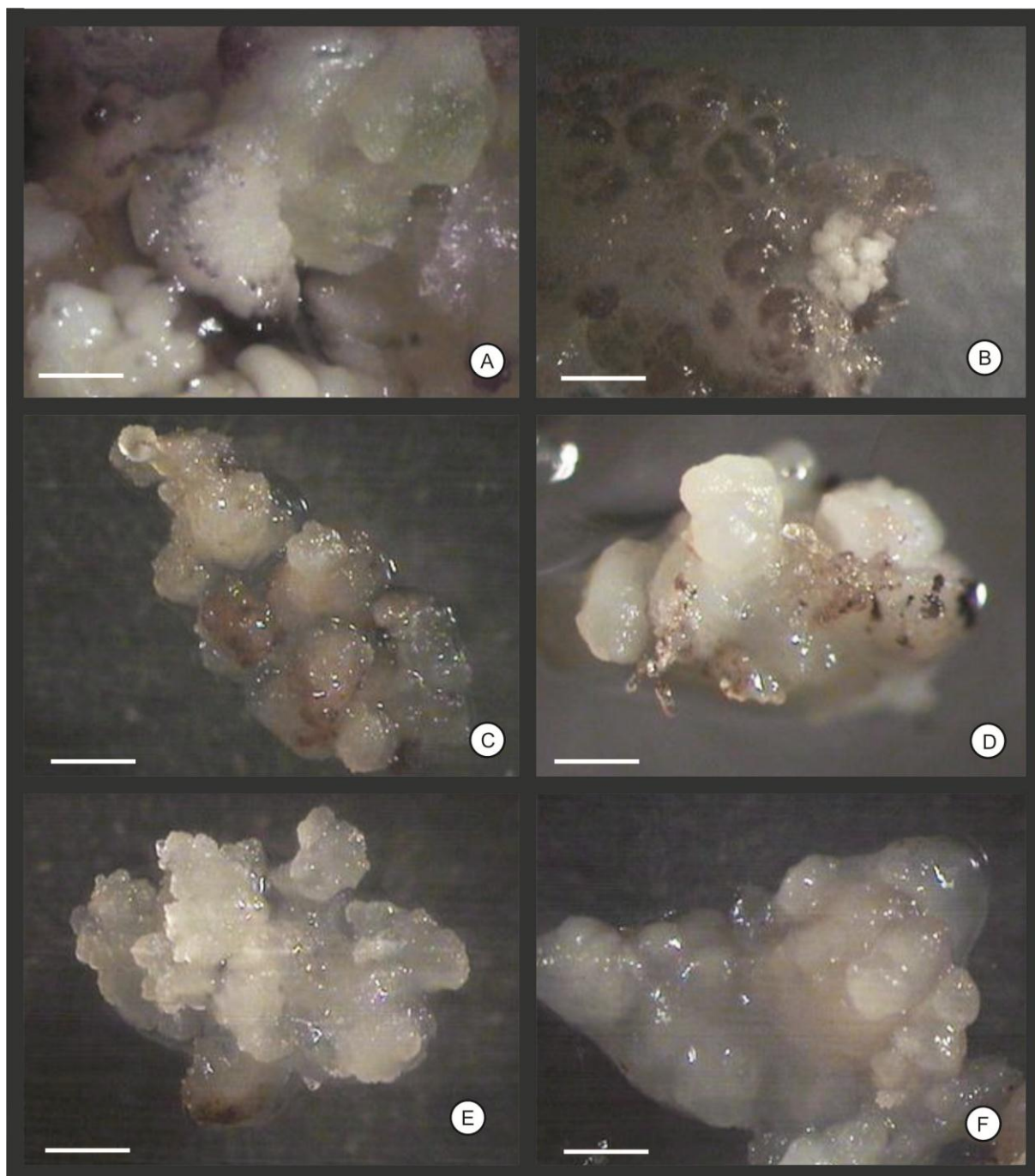


Figura 5: Calos embriogênicos em meio de maturação, acrescido com manitol. A: Partes esverdeadas em meio com 30gL^{-1} de manitol, sem ABA. B: escurecimento em uma porção do explante em meio acrescido de 30gL^{-1} de manitol, com ABA. C: Necrose em parte do explante, em meio com 60gL^{-1} de manitol, sem ABA. D: Explante com um coloração esbranquiçada, em meio acrescido de 60gL^{-1} de manitol, com ABA. E e F: Explante com um coloração esbranquiçada, em meio acrescido de 90gL^{-1} de manitol, com e sem ABA. Barras: A=B=C=D=E=F= 1cm.

Nos tratamentos com sacarose foram observados muitos explantes necrosados, entretanto em alguns tratamentos o escurecimento não foi prejudicial, sendo que os embriões regeneraram em plantas. Segundo Gill et al. (2004) os compostos fenólicos aparecem quando ocorre uma injúria no explante. Estes compostos, que estão no vacúolo se misturam com os conteúdos dos plastídios e aparecem os pigmentos negros.

Os embriões somáticos em meio de cultura sem ABA apresentaram pontos esverdeados, no tratamento com 30 gL⁻¹ e 60 gL⁻¹ de sacarose. Foi observada a presença de raízes no tratamento com 30 g.L⁻¹ de sacarose sem ABA.

No tratamento com 30 gL⁻¹ de sacarose com ABA os embriões apresentaram um pequeno escurecimento em parte do explante, entretanto a parte não necrosada tinha aspecto compacto, com textura firme e coloração esbranquiçada.

De acordo com Gill et al. (2004) a mudança da fonte de carbono, de sacarose (3%) para maltose (3%) resultou em alta porcentagem de calos embriogênicos.

Foi observado inicialmente um arroxamento em alguns pontos dos embriões somáticos, no tratamento com 60 gL⁻¹ de sacarose e ABA. Ao final dos 15 dias estas partes apresentavam-se escurecidas, com aparência de necrosadas. Entretanto as partes não necrosadas tinham uma coloração esbranquiçada e uma aparência compacta.

Segundo Konar e Nataraja (1969) a utilização de 5% de sacarose inibiu ligeiramente o processo de formação de embriões somáticos em *Ranunculus*. Esta observação está de acordo com o presente trabalho, em que na dose de 60 gL⁻¹ foi observado escurecimento dos explantes e na concentração de 90 gL⁻¹ ocorreu escurecimento e necrose dos explantes.

Korbes et al. (2005) trabalhando com soja, observaram a germinação precoce de muitos embriões em meio de maturação e a conversão em plantas. A sacarose em alta concentração pode atuar como fonte de carbono e regulador osmótico.

4.5. Germinação dos embriões somáticos

Os explantes que não se apresentavam necrosados no experimento da maturação foram transferidos para o meio de regeneração.

Houve interação significativa entre a sacarose e o manitol na obtenção de plântulas ($P < 0,05$). O meio de cultura com sacarose apresentou maior média de plântulas formadas (8,66) em relação ao manitol, que formou apenas uma planta.

Com relação às doses, foi verificada diferença significativa com relação à formação de plântulas, sendo que nas doses mais altas, tanto do manitol, quanto da sacarose, houve decréscimo no número de plantas formadas (Figura 6).

De acordo com Orias-Akins et al. (1982) a adição de 1 mgL^{-1} de GA_3 em meio de regeneração não apresentou efeito na formação de parte aérea de trigo, entretanto, contribuiu para a formação de raízes.

Ahloowalia et al. (1983) utilizaram gemas axilares de cana-de-açúcar como explantes e observaram o desenvolvimento de grande quantidade de raízes na superfície dos calos, quando estes eram transferidos para meio de formação, contendo meio MS com metade da concentração de sais, acrescido de 60 g.L^{-1} de sacarose. Segundo os autores é importante a redução da concentração de sais no meio, para a conversão dos embriões somáticos em plântulas. Resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho foi observado por Gill et al. (2003). Estes autores relataram o desenvolvimento da parte aérea 15 a 20 dias após transferência dos embriões para meio com metade da concentração do meio MS. De acordo com estes autores o enraizamento ocorreu em meio MS suplementado com 5 mg L^{-1} de ANA e 7% de sacarose, sendo a alta concentração de sacarose necessária para a indução das raízes. Mittal et al. (2009) utilizaram o mesmo meio de enraizamento adicionando 2 mg L^{-1} de AIB e obtiveram plântulas com parte aérea e raízes bem desenvolvidas.

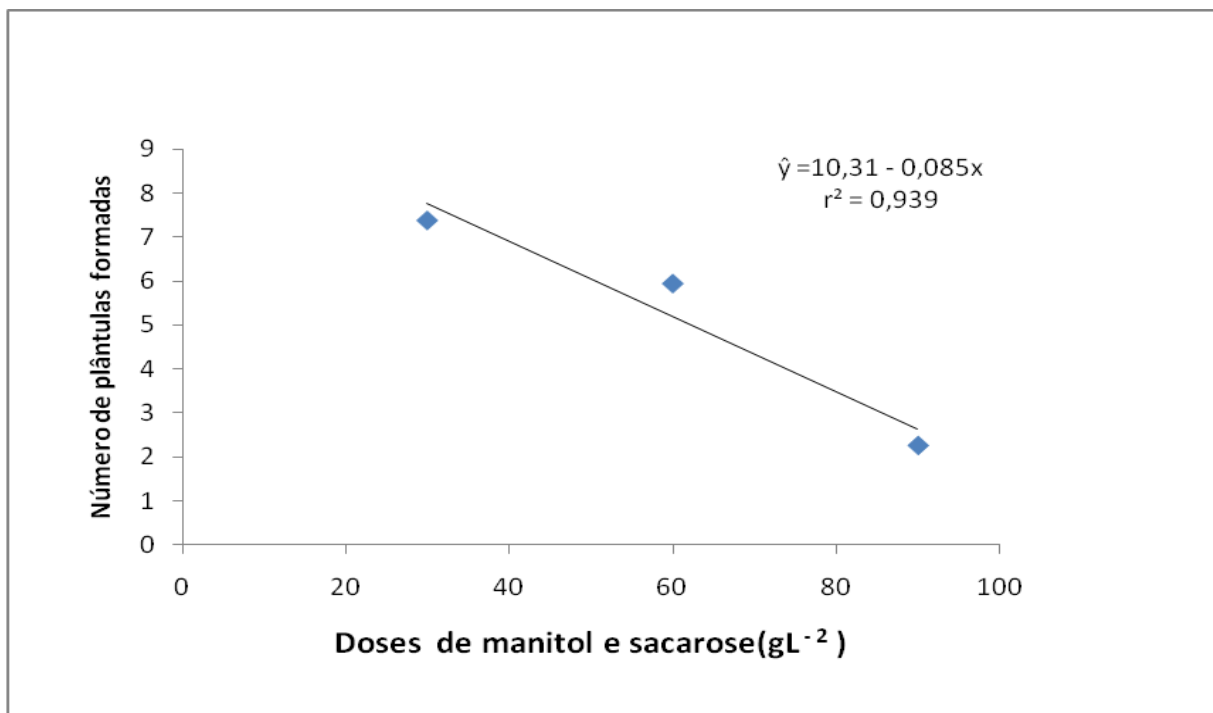


Figura 6. Número de plântulas formadas, das variedades RB867515 e RB928064, aos 30 dias em meio de germinação, contendo 1 mg.L⁻¹ de GA₃ e BAP, advindos do experimento de maturação.

4.6. Microscopia de luz

Os segmentos foliares foram inoculados em sentido longitudinal, em meio de indução, acrescido de auxinas de acordo com o tratamento (Figura 7A). Observa-se a presença de várias camadas de primórdios foliares (Figura 7B). Foi observado intumescimento dos explantes aos 2 dias após a indução. Observou-se a presença de reentrâncias na face abaxial da folha, provavelmente devido à divisão das células do parênquima logo abaixo da epiderme (Figura 7C). Foram observadas divisões celulares no sentido anticlinal na epiderme superior e inferior do explante foliar (Figura 7D). Pode-se observar muitas células com nucléolo denso, alta relação núcleo/citoplasma e parede celular fina, características de células meristemáticas e em intensa divisão celular. Ho e Vasil (1983) descreveram, em explantes de cana-de-açúcar, divisões celulares nas células do parênquima, próximas ao feixe vascular, nas células da bainha do feixe vascular, no mesofilo e nas células epidérmicas. Segundo esses autores, a divisão iniciou-se na região abaxial do mesofilo, nas células adjacentes dos feixes vasculares

e posteriormente nas células parenquimáticas do floema. Ocasionalmente, segundo esses autores, foram observadas divisões celulares nas células parenquimáticas do xilema.

No terceiro dia em meio de indução foram observadas células meristemáticas nas regiões mais distantes do feixe da nervura principal, evidenciando o provável início de proliferação celular e posterior calejamento nas extremidades do explante. Foi possível observar o metaxilema desenvolvido (Figura 7E) e as células com citoplasma mais denso e núcleo e nucléolos evidentes, nas regiões próximas aos feixes vasculares e do mesofilo e a continuação das divisões anticlinais na epiderme foliar (Figura 7F e G).

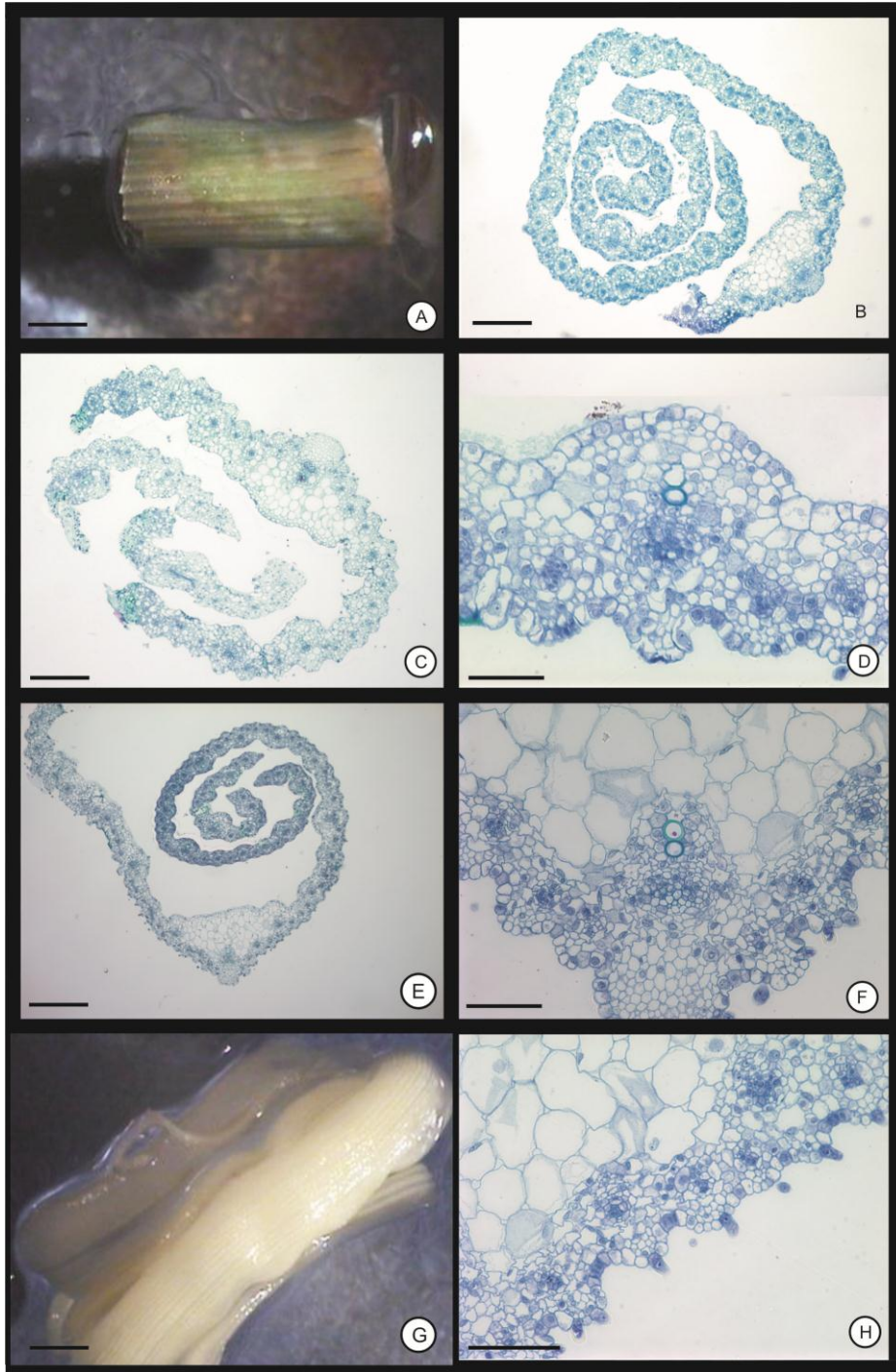


Figura 7: Formação de calos embriogênicos em folhas imaturas de cana-de-açúcar. A: Explante foliar inicial em meio de indução. B: Secção transversal do explante foliar inicial de cana-de-açúcar. C: Secção transversal da folha de cana-de-açúcar, mostrando presença de reentrâncias na epiderme foliar abaxial aos 2 dias em meio de indução. D: Detalhe da folha e divisões celulares no sentido anticlinal na epiderme superior e inferior do explante foliar aos 2 dias em meio de indução. E: Secção transversal da folha de cana-de-açúcar aos 3 dias em meio de indução. F: Presença de células meristemáticas nas regiões mais distantes do feixe da nervura principal, aos 3 dias em meio de indução. G: Segmento foliar aos 3 dias em meio de indução, mostrando o intumescimento do explante. H: Detalhe das células com citoplasma denso e núcleo e nucléolo proeminentes, na região epidérmica e subepidérmica, aos 3 dias em meio de indução. Barras: A=G=1 mm. B=C=E=400 μ m. D=F=H= 100 μ m.

Após 5 dias em meio de indução, é possível observar início de calejamento nas extremidades dos explantes. Estes calos tinham uma coloração branca, com aspecto translúcido (Figura 8A). Pode-se observar o rompimento da epiderme em vários locais da lâmina foliar, nas folhas mais externas (Figura 8B). Nesta fase observa-se a proliferação de células a partir da epiderme e das células parenquimáticas. Na parte mais externa, as células são volumosas, com citoplasma menos denso, enquanto as células da região mais interna são menores, com citoplasma mais denso e nucléolos evidentes. Observa-se também um conjunto de células justapostas, ao redor das células meristemáticas, podendo-se supor ser a formação de protoderme (Figura 8C).

Aos 10 dias após indução, foi possível observar a proliferação celular nas extremidades do explante (Figura 8D). Em explantes foliares de cana-de-açúcar, é possível observar também a intensa divisão das células, tanto das células embriogênicas quanto das células do parênquima do explante (Figura 8E e F). Estes resultados estão de acordo com Ho e Vasil (1983 a), que aos 8 dias após indução, observaram a formação de calos nas extremidades e próximo aos feixes vasculares dos explantes foliares.

Nadar et al. (1978) observaram a presença de células com parede fina, citoplasma denso e não vacuolizadas, aos 11 dias após transferência para meio contendo 15 μ M de 2,4-D.

Aos 15 dias após indução é possível observar a formação de estruturas organizadas e individualizadas (Figura 8G). Observaram-se regiões embriogênicas, com epiderme definida e grande quantidade de células meristemáticas (Figura 8H). As massas meristemáticas eram formadas por células pequenas, isodiamétricas, de citoplasma denso, com alta relação núcleo/citoplasma e núcleo evidente (Figura 8I).

Aos 30 dias após a inoculação em meio de indução era possível observar a proliferação de estruturas globulares com aspecto firme e compacto e coloração amarelada na extremidade do explante (Figura 8J). As seções histológicas demonstraram a intensa multiplicação celular e as divisões no sentido periclinal das estruturas globulares (Figura 8K).

Os embriões globulares possuem células com núcleo e nucléolos proeminentes e reduzida vacuolização, apresentando, individualização em relação às células parenquimáticas (Figura 8L).

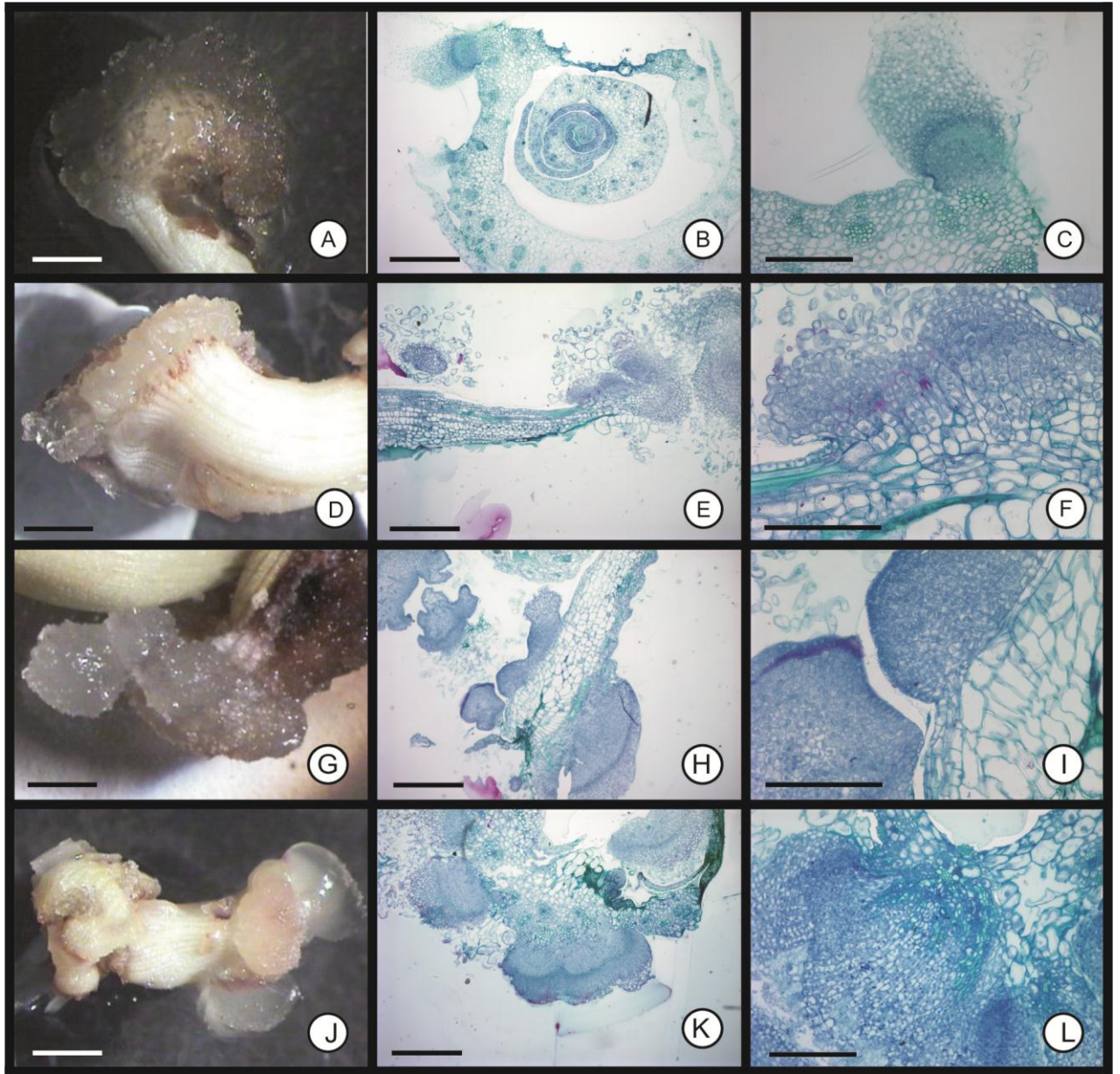


Figura 8: Início de formação de calos embriogênicos em explantes foliares de cana-de-açúcar. A: Formação de calos embriogênicos na extremidade do explante, aos 5 dias após indução. B: Secção transversal do explante, aos 5 dias após indução, mostrando o início de proliferação de calos embriogênicos. C: Detalhe da proliferação de calos, aos 5 dias após indução. D: Formação de calos embriogênicos na extremidade do explante, aos 10 dias após indução. E: Secção longitudinal do explante, aos 10 dias após indução mostrando o início de proliferação de calos embriogênicos na extremidade do explante. F: Detalhe da secção longitudinal do explante, aos 10 dias após indução. G: Formação de calos embriogênicos na extremidade do explante, aos 15 dias após indução. H: Secção longitudinal do explante, aos 15 dias após indução mostrando a proliferação de calos embriogênicos. I: Detalhe da proliferação de calos, aos 15 dias após indução. J: Formação de calos na extremidade do explante, aos 30 dias após indução. K: Secção transversal do explante, aos 30 dias após indução mostrando a proliferação de calos por toda a extremidade do explante. L: Detalhe da proliferação de calos, aos 30 dias após indução. Barras: A=D=G=J=1 mm. B=E=H=K=400 μ m. C=200 μ m. F=I=L=100 μ m.

Aos 30 dias após indução, os calos embriogênicos foram recultivados para mesmo meio.

Estes calos foram mantidos neste meio por mais 30 dias e ao final desse período foram coletados para a realização das análises anatômicas.

Foi realizado o teste histoquímico com o azul de Evans (0,1%) e o carmin acético (2%), para avaliar e confirmar a natureza embriogênica dos calos. As células que reagem fortemente ao carmin acético e fracamente ao azul de Evans são embriogênicas e células com reação fraca ao primeiro e intermediária ao segundo são células não embriogênicas (Durzan, 1988).

As estruturas que reagiram ao carmin acético (estruturas avermelhadas) confirmaram a característica embriogênica do material em estudo. A coloração azul confirma a presença de células não embriogênicas (Figura 9 A).

Os cortes histológicos dos embriões somáticos formados revelaram a presença de protoderme bem definida, regiões meristemáticas nas extremidades, com células em diferenciação, com citoplasma denso, alta relação núcleo/citoplasma e núcleos evidentes, características de estruturas embriogênicas, e regiões com células alongadas, vacuolizadas e citoplasma menos denso, características de regiões não embriogênicas (Figura 9B).

Através de análises histológicas dessas estruturas formadas na extremidade do explante, identificam-se embriões somáticos e diferentes fases de desenvolvimento. Esse padrão de citodiferenciação foi observado por Nadar et al. (1978), em calos de cana-de-açúcar induzidos com 15 μ M de 2,4-D. Aos 60 dias após indução, os calos embriogênicos foram transferidos para meio contendo baixa concentração de 2,4-D (2,26 μ M). Com 15 dias em meio com baixa concentração de 2,4-D (2,26 μ M), foram observados muitos embriões globulares, de coloração esbranquiçada, que se destacavam facilmente do explante junto com células de coloração creme amareladas, provavelmente não embriogênicas (Figura 9C). Pelas análises histológicas, observou-se que estes embriões globulares não tinham conexão aos tecidos adjacentes e era possível observar a presença de uma protoderme bem definida (Figura 9D). Confirmando essa forma a via embriogênica do material em estudo. Entretanto, Falco et al. (1996) trabalhando com folhas jovens de cana-de-açúcar, observaram a presença de ápices caulinares, entretanto, estes tinham conexão com os explantes de origem, confirmando a ocorrência de organogênese e não embriogênese somática. Estes autores citam também a

observação de estruturas bipolares, com ausência de conexão vascular com os tecidos de origem, sugerindo serem embriões somáticos, concluindo dessa forma, a presença das duas vias morfogênicas (embriogênese somática e organogênese) no mesmo material de cultivo.

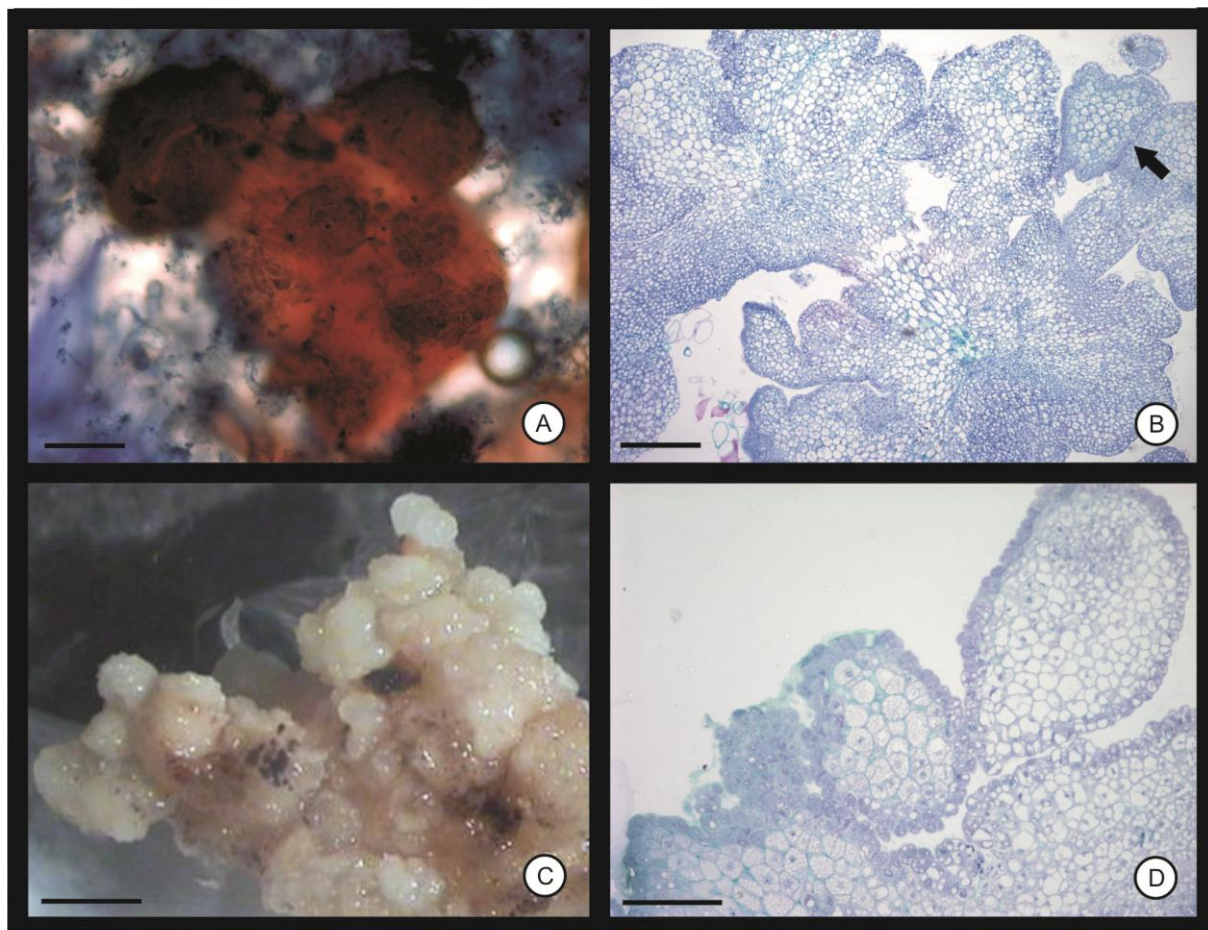


Figura 9: A: Massa embriogênica da variedade RB867515, aos 30 dias após subcultivo, no mesmo meio de indução. A: Teste do carmim acético e azul de Evans aos 30 dias após subcultivo. As células vermelhas revelam a característica embriogênica dos embriões. B: Cortes histológicos das massas embriogênicas com protoderme bem definida e regiões meristemáticas nas extremidades dos embriões (seta), aos 30 dias após subcultivo. C: Embriões globulares, que se soltavam facilmente, com coloração esbranquiçada, aos 15 dias em meio com 2,26 μ M de 2,4-D. D: Cortes histológicos dos embriões globulares aos 15 dias em meio com 2,26 μ M de 2,4-D, evidenciando a não conexão vascular com os tecidos do explante inicial. E: Barras: A=C=1mm. B=400 μ m. D= 200 μ m

Após 20 dias em meio de maturação foram observados embriões somáticos (Figura 10A). As análises histológicas demonstraram a presença de embriões somáticos contendo os ápices caulinares e radiculares, apresentando sistema vascular fechado, com protoderme característica e com ausência de ligação aos tecidos do explante que lhe deu origem. É possível observar também as estruturas que caracterizam o embrião zigótico das monocotiledôneas, como a presença de coleóptilo e coleoriza e escutelo (Figura 10B).

O embrião zigótico (Figura 10C) se caracteriza pela presença do escutelo, do coleóptilo e pela coleoriza (Figura 9D).

Ho et al., 1983 caracterizaram o embrião somático de cana-de-açúcar, onde o ápice foi a primeira região a se organizar e posteriormente, ocorreu a organização do ápice radicular. O escutelo consiste de células largas com muitos grãos de amido. O embrião apresenta o coleóptilo protegendo os primórdios foliares e a coleoriza, protegendo o meristema radicular.

Os explantes não necrosados e os embriões que iniciaram o processo de germinação precoce (Figura 10E), foram transferidos para meio de germinação, contendo 1 mgL^{-1} de GA_3 e BAP.

As plântulas regeneradas foram transferidas para frascos contendo meio MS com a mesma concentração de citocinina e GA_3 e acrescido de $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA para proporcionar o enraizamento (Figura 10F).

Após 30 dias as plântulas foram transferidas para vasos e levadas para casa-de-vegetação (Figura 10G).

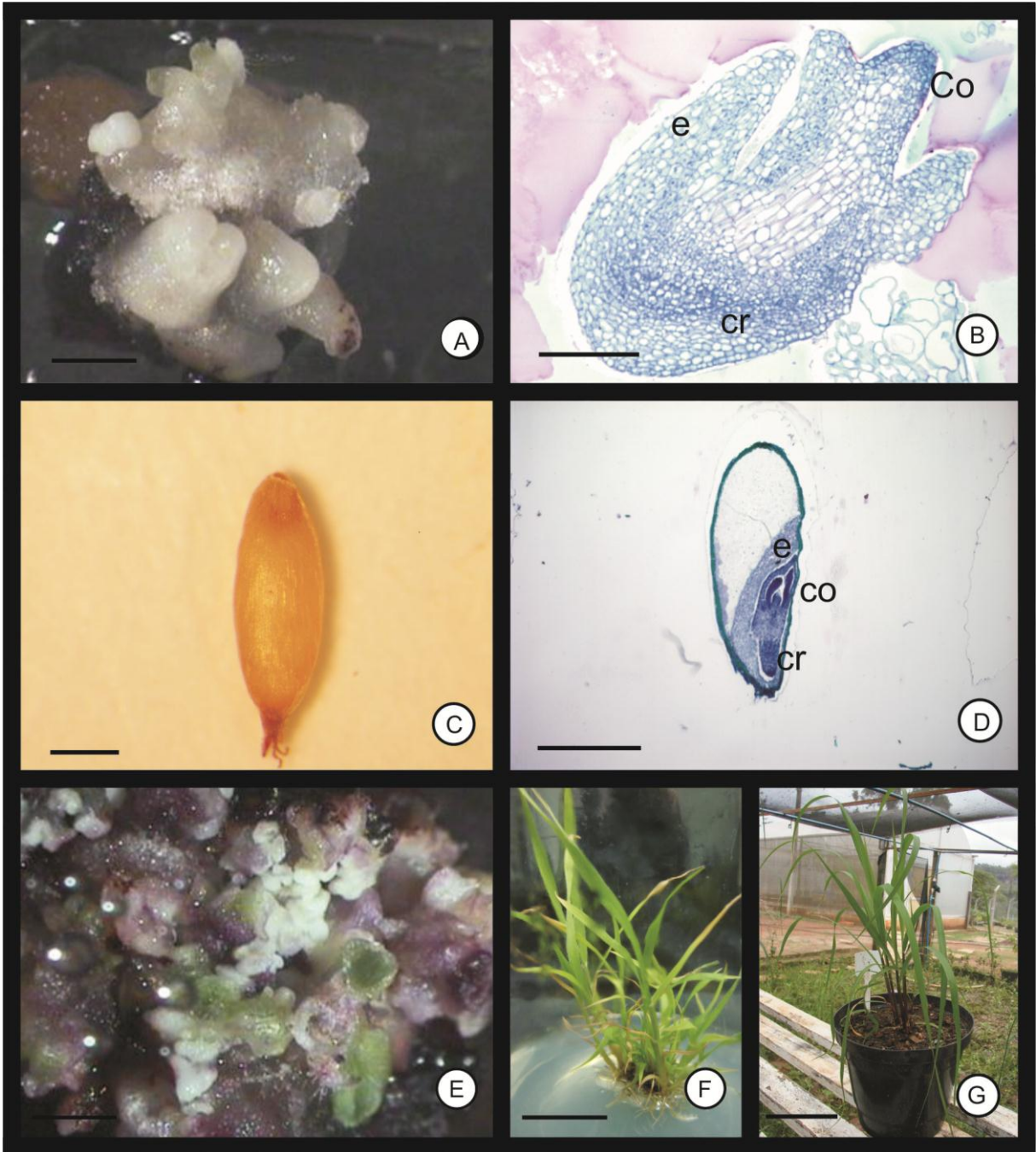


Figura 10: Embriões somáticos de cana-de-açúcar em meio de germinação da variedade RB867515. A: embrião somático em meio de maturação, contendo 30gL^{-1} de sacarose e $5\mu\text{M}$ de ABA. B: Corte transversal de um embrião somático de cana-de-açúcar, mostrando o ápice caulinar e o radicular, com sistema vascular fechado, sem conexão com o explante inicial. C: Semente de cana-de-açúcar. D: Semente de cana-de-açúcar em corte longitudinal, mostrando o embrião zigótico, com o escutelo, o coleptilo e a coleorriza. E: Embrião somático em início de germinação em meio de regeneração. F: Plântula formada em meio de enraizamento. G: Planta em vaso em casa-de-vegetação. co: coleoptilo, cr: coleorriza, e: escutelo. Barras: A=C=E=1mm. B=D=400 μm . F= 1cm. G=10cm.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

- A indução de calos embriogênicos de cana-de-açúcar pode ocorrer com a adição ao meio MS de alta concentração (20 μ M de 2,4-D) e os embriões somáticos podem ser obtidos transferindo esses calos para meio com baixa concentração de 2,4-D(2,26 μ M).
- Embriões somático maduros podem ser obtidos com 30gL⁻¹ de sacarose e 5 μ M de ABA.
- A microscopia de luz contribui para a caracterização do processo embriogênico e confirmar a embriogênese somática das variedades de cana-de-açúcar, de acordo com os tratamentos aplicados, o que pode contribuir para outros estudos das vias morfogênicas nas variedades estudadas.
- Embora a regeneração de plantas ocorra em baixa porcentagem, os embriões somáticos de cana-de-açúcar formaram plântulas normais e vigorosas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFTAB, F.; ZAFAR, Y.; MALIK, K. A.; IQBAL, J. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts in sugarcane (*Saccharum* spp.hybrid cv. CoL-54). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.44, n. 1, 71-78,1996.
- AHLOOWALIA, B. S.; MARETZKI, A. Plant Regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. **Plant Cell Report** v. 2, p. 21-25, 1983.
- ALBINO, J. C.; CRESTE S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento genético da cana-de-açúcar. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. n. 36. 2006.
- AMMIRATO, P.V., STEWARD, F.C. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. **Botanical Gazette**, v.132. p.149-158,1971.
- AMMIRATO, P.V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: WITHERS, L.S.; ALDERSON, P.G. (Eds). **Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications**. London: Butterworths, 1986. p. 23-45.
- BAKOS, Á.; BORSICS, T.; TOLDI, O.; BABOS, K.; LADOS, M. Evidence for somatic embryogenesis during plant regeneration from seedling-derived callus of dodder (*Cuscuta trifolii* Bab. et Gibs). **Plant Cell Report**, v.19, n.5, p. 525-528, 2000.
- BELTRATI, C.M.; PAOLI, A.A.S.; Semente. In: Appezzato-da-Glória et al. (Eds.). **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2006. v. 2, p. 399-412.
- BLANCO, M.A., NIEVES, N., SÁNCHEZ, M., BORROTO, C.G., CASTILLO, R., GONZÁLEZ, J.L., ESCALONA, M., BÁEZ, E. & HERNANDÉZ, Z. Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 51, p.153-158, 1997.
- BOZHKO, P.V.; FILONOVA, L.H., VON ARNOLD, S. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n.6, p. 20, 2002.

BRISIBE, E.A.; MIYAKE, T.T.; MAEDA, E. Regulation of somatic embryogenesis in long-term callus cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **New Phytologist**, v. 126, p.301-307, 1994.

BRISIBE, E.A.; MIYAKE, T.T.; MAEDA, E. Absciscic acid and high osmoticum regulation of development and storage reverse accumulation in sugarcane somatic embryos. **Japanese Journal of Crop Science**, v.63, n. 4, p. 689-698, 1994.

CAIEIRO, J.T.; PANOBIANCO, M.; BESPALHOK FILHO, J.C.; OHLSON, O.C. Physical purity and germination of sugarcane seeds (Caryopses) (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p. 140-145, 2010.

CAMPOS, J.M.S. de; CALDERANO, C. de A.; PEREIRA, A.V.; DAVIDE, L.C.; VICCINI, L.F.; SANTOS, M. de O. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.38-44, 2009.

CARMAN, J. G. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behaviour. **In Vitro Cellular Development Biology**, v. 26, p. 746–753, 1990.

Catálogo Nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor sucroalcooleiro (RIDESA). Curitiba, 2010. p. 136.

CHEN, W. H.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; COCKING, E. C. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. **Journal of Experimental Botanic**, v. 39, p.251–261, 1988.

CHENGARARAYAN, K.; GALLO-MEAGHER, M. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. **In Vitro Cellular. Development Biology-Plant** v. 37, p. 434-439, 2001.

CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p.385-391, 2006.

COMPAINHA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB - **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar – Safra 2009/2010 – Terceiro levantamento – Dezembro/2009**. Brasília: CONAB, 2009. 16p.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution in sugarcane. In: D.J., Heinz (ed). **Sugarcane Improvement Through Breeding**. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p. 7–84, 1987.

DEMIRBAS, A. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. **Energy Conversion and Management**. v.42, p.1357-1378, 2001.

DESAI, N. S.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.) **Current Science**, v. 87, n. 6, 2004.

DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal Experimental Botany** v.48, p.1493–1509, 1997.

DUDITS, D.; NEMET, G.; HAYDU, Z. Study of callus growth and organ formation in wheat(*Triticum aestivum*) tissue cultures. **Canadian Journal of Botany**, v. 53, n. 10, p. 957-963, 1975.

DURZAN, D. J. Process Control in somatic polyembryogenesis. In: J.E. Hallgren. **Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology**. V.8, p.147. Swedish University of Agricultural Sciences.

FEHÉR, A., PASTERNAK, T. P., DUDITS, D.: Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ**. v.74: p. 201-228, 2003.

FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; NETO, A.T.; Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.1, p. 1-6, 1996 a.

FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; NETO, A.T.; GLÓRIA, B. A. Histological characterization of in vitro regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.2, p. 93-97, 1996 b.

FERRAREZI, G. C. VIEIRA, F. M. Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. n.15, 2009.

FISCHER, C.; NEUHAUS, G. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. **The Plant Journal**. v. 9, p. 659-669. 1996.

FITCH, M.M.M. & MOORE, P.H. Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 20, p.157-163, 1990.

GALLO-MEAGHER, M.; ENGLISH, R. G.; ABOUZID, A. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. **In Vitro Cellular Development Biological-Plant**, v.36, p. 37–40; 2000.

GANDONOU, Ch.; ERRABII, T; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; CHIBI, F; SENHAJI, N. SKALI. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n.11, p. 1250-1255, 2005.

GARCIA, R.; CIDADE, D.; CASTELLAR, A.; LIPS, A.; MAGIOLI, C.; CALLADO, C.; MANSUR, E. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugar cane are determined

by light and type of growth regulator. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 90, p.181-190, 2007.

GATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; BUSO J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa-CBAB. v.2, p. 533-568, 1998.

GILL, N. K.; GILL, R.; GOSAL, S.S. Factoring enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p.119-123, 2004.

GRASS PHYLOGENY WORKING GROUP - GPWG. Phylogeny and subfamilial classification of grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 88, p.373-457, 2001.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa-CBAB. v.2, p. 533-568, 1999.

GUERRA, M. P., DAL VESCO, L., DUCROQUET, J. P. H. J., NODARI, R. O., REIS, M. S. Somatic embryogenesis in Goiabeira Serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.117-128, 2001.

HACCIUS, B. Question of unicelular origino f non-zigotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v.28, p.74 81,1978.

HENRY, R. J.; Basic Information on the Sugarcane. In: Henry, R. J.; Kole, C.(Ed.). **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. Science Publishers, 2010. p.1-9.

HO, W.J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, v.118, p. 169-180, 1983 a.

HO, W.J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. **Annals of Botany**. v. 51, p. 719-726, 1983 b.

IRVINE, J.E.; BENDA, G.T.A. Transmission of Sugarcane diseases in plant derived by rapid regeneration from diseased leaf tissue. **Sugarcane**, v. 6, p.14-16, 1987.

JHA, P.; YADAV, C. B.; ANJALIAH, V.; BHAT,V. In vitro plant regeneration through somatic embryogenesis and direct shoot organogenesis in Pennisetum glaucum (L.) R. Br. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**, v.45. p. 145–154, 2009.

JIMENEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.196–223, 2001.

JIMENEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v.47, p.91-110, 2005.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-hill book Co. Inc, 1940. 423p.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.105, p.359-368, 1982.

KONAR, R.N. & NAKARAJA, K. Morphogenesis of isolated floral buds of *Ranunculus sceleratus* L. *in vitro*. **Acta Botanica**, v. 18, p. 680-699, 1969.

KONG, L.; ATTREE, S.M.; FOWKE, L.C. Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 23-30, 1997.

KÖRBES, A.P; DROSTE, A. Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.3, p.211-216, 2005.

LAKSHMANAN, P.; R. J. GEIJSKES; AITKEN, K.; GROF, C.; BONNETT, G.; SMITH, G. Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.41, n.4, p.345-363, 2005.

LAKSHMANAN, P. Invited review addendum: Somatic embryogenesis in sugarcane-an addendum to the invited review "Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities". **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.42, n.4, p.201-205, 2006.

LORENZO, J. C.; OJEDA, E.; ESPINOSA, A.; BORROTO, C. Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants. **In Vitro Cellular Development Biology Plant**, v. 37, p. 803-806; 2001.

LIU, M.C. Factors affecting induction, somatic embryogenesis and plant regeneration of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, v.141, p.714-720, 1993.

MACEDO, A. F. Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>, capturado em 15/06/2011.

MIRAGAYA, J. C. G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. **Informe Agropecuário** 26: 7-13, 2005.

MITTAL, P.; GOSAL, S. S.; SENGER, A.; KUMAR, P. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in Sugarcane. **Physiology Molecular e Biological Plants**, v. 15, n.3, p. 257-265, 2009.

MORRIS, P. C.; WEILER, E.W.; MADDOCK, S.E.; JONES, M.G.K.; LENTON, J.R.; BOWLLES, D.J. Determination of endogenous abscisic acid levels in immature cereal embryos during *in vitro* culture. **Planta**, v. 173, p. 110-116, 1988.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em Macaúba: Indução, regeneração e caracterização anatômica**. Viçosa: UFV, 2007. 66f. Tese (Doutorado).

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y. Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of guava tree cv. Paluma. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 507-511, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

NADAR, H.M.; SOEPRAPTOPO, S.; HEINZ, D.J.;LADD, S.L. Fine structure of Sugarcane (*Saccharum* sp.) callus and the role of auxin in embryogenesis. **Crop Science**, v. 18, p.210-216, 1978.

NAMASIVAYAM P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 90, n.1, p. 1-8, 2007.

NARDIM, R. R., **Torta-de-filtro aplicada em Argissolo e seus efeitos agrônômicos em duas variedades de cana-de-açúcar colhidas em duas épocas**. São Paulo: IAC (Campinas), 2007. 51f. Dissertação (Mestrado).

NEIBAUR, I.; GALLO, M.; ALPETER, F. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). **In Vitro Cellular e Developmental Biology**, v. 44, n. 6, p. 480-486.

NIEVES, N.; SAGARRA, F.; GONZÁLEZ, R.; LEZCANO, Y.; CID, M.; BLANCO, M. A.; CASTILLO, R. Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum* sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 95, p.313-320, 2008.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

ORIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Plant regeneration from cultured immature embruos and inflorescences of *Triticum aestivum* L.: Evidence for somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 110, p. 95-105, 1982.

OROPEZA, M.; GARCIA, E. Somaclonal variants resistant to sugarcane mosaic virus and their agronomic characterization. **In Vitro Cellular Development Biological- Plant**, v. 32, p. 26-30, 1996.

POEAIM A.; MATSUDA Y.; MURATA T. Plant regeneration from immature inflorescence of zoysiagrass (*Zoysia* spp.). **Plant Biotechnology** v. 22, n.3, p. 245-248, 2005.

PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.1, p.26-37, 1995.

RASHID, H.; KHAN, S. A.; ZIA, M.; CHAUDHARY, M. F.; HANIF Z.; CHAUDARY, Z. CALLUS INDUCTION AND REGENERATION IN ELITE SUGARCANE CULTIVAR HSF-240. **Pakistan Journal of Botany**, v.41, n.4, p.1645-1649, 2009.

RIDESA (Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro) <http://www.ridesa.com.br>. Capturado em 15/06/2011.

RODRÍGUEZ, S.; MONDÉJAR, C.; RAMOS, M.E.; DÍAZ, E.; MARIBONA, R.; ANCHETA, O. Sugarcane somatic embryogenesis: a scanning electron microscopy study. **Tissue & Cell**, v.28, n. 2, 149-154, 1997.

SAMOYLOV, V. M.; TUCKER, D. M.; PARROTT, W. A. Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.) embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v. 34, p. 8-13, 1998.

SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Imprensa Nacional, 1990. 443p.

SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKE, E. Anatomy of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Somatic embryogenesis and synthetic seed I**. Berlin: Springer-Verlag, p. 3 -19, 1995.

SHARP, W.R.; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology of in vitro sexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**, v.2, p.268-310, 1980.

SNYMAN, S.; MEYER, G.; RICHARDS, J.; HARICHARAN, N.; RAMGAREEB, S.; HUCKETT, B. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Report** ;v. 25, n. 10, p. 1016-1023, 2006.

TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers, **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1873-1899, 1991.

ÚNICA (União da Indústria de cana-de-açúcar). <http://www.unica.com.br>. Capturado em 15/06/2011.

VEGA, R.; VÁSQUEZ, N.; ESPINOZA, A.M.; GATICA, A. M.; MELARA, M. V. Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). **Revista Biología Tropical**, v. 57, n. 1, p. 141-150, 2009.

WALKER, P. N.; HARRIS, J. P.; GAUTZ, L. D. Optimal environment for sugarcane micropropagation. **Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 34, p.2609–2614; 1991.

WANG, Z.; HEINEMANN, P. H.; SOMMER, H. J. III; WALKER, P. N.; MORROW, C. T.; HEUSER, C. Identification and separation of micropropagated sugarcane shoots based on the

Hough transform. **Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 41, p. 1535–1541; 1998.

WATT, M. P; BANASIAK, M.; REDDY, D.; ALBERTSE, E. H.; SNYMAN, S. J. In vitro minimal growth storage of *Saccharum* spp. Hybrid (genotype 88H0019) at two stages of direct somatic embryogenic regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 96, p.263–271, 2009.

WEBER H, BORISJUK L, WOBUS U. Sugar import and metabolism during seed development. **Trends Plant Science**, v. 2, p.169–174, 1997.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis factors influencing coordinated of cells as in embryogenic group. **Annals of botany**, v.57, p.443-462, 1986.

YANG, C.; ZHAO, T.; YU, D.; GAI, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration in chinese soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)—impacts of mannitol, abscisic acid, and explant age. **In vitro cellular development biology-Plant**, v. 45, p.180–188, 2009.

YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. p.205-247, 1995.

YEUNG, E.C. The use of histology in the study of plant tissue culture systems-some practical comments. **In vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v. 35, 137-143, 1999.

ZIMMERMAN, L. LYNN. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

ANEXO

Tabela 1: Quadro da análise de variância para a indução de calos embriogênicos em explantes foliares de cana-de-açúcar *in vitro*

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)
Bloco	2	2818.7	1409.4	15.7155	2.304e ⁻⁰⁶
variedade	2	124.3	62.1	0.6929	0.5035
reg	2	8374.3	4187.1	46.6900	1.308e ⁻¹³ ***
dose	3	5934.2	1978.1	22.0569	3.666e ⁻¹⁰ ***
var x reg	4	436.2	109.1	1.2160	0.3118
var x dose	6	211.5	35.3	0.3931	0.8811
reg x dose	6	383.7	64.0	0.7132	0.6401
var x reg x dose	12	598.4	49.9	0.5560	0.8694
Resíduo	70	6277.6	89.7		

*** Significativo a 5% (Pr > F)

Tabela 2: Quadro da análise de variância para a multiplicação de calos embriogênicos de cana-de-açúcar *in vitro*

F.V	GL	SQ	QM	F
tempo	6	41.108	6.8513	125.5171
varxtempo	6	9.237	1.5395	28.2045 ***
dosextempo	12	0.449	0.0374	0.6852
varxdosextempo	12	0.152	0.0127	0.2318
Resíduo	108	5.895	0.0546	

*** Significativo a 5%

Tabela 3: Quadro da análise de variância para a maturação embriões somáticos de cana-de-açúcar *in vitro*, com relação à necrose

F.V.	GL	SQ	QM	F
var	1	1.68	1.68	0.0518
acucar	1	415.68	415.68	12.8176 ***
dose	2	20.58	10.29	0.3173
reg	1	28.13	28.13	0.8672
varxacucar	1	7.35	7.35	0.2266
varxdose	2	71.36	35.68	1.1002
acucarxdose	2	4.69	2.35	0.0724
varxreg	1	23.35	23.35	0.7199
acucarxreg	1	0.68	0.68	0.0210
dosexreg	2	25.08	12.54	0.3867
varxacucarxdose	2	66.03	33.01	1.0180
varxacucarxreg	1	0.68	0.68	0.0210
varxdosexreg	2	90.53	45.26	1.3957
acucarxdosexreg	2	110.86	55.43	1.7092
varxacucarxdosexreg	2	29.53	14.76	0.4552
Resíduo	48	1556.67	32.43	

*** Significativo a 5%

Tabela 4: Quadro da análise de variância para a regeneração de embriões somáticos de cana-de-açúcar

F.V.	GL	SQ	QM	F	
variedade	1	13.02	13.02	0.4423	
açúcar	1	581.02	581.02	19.7374	***
dose	2	223.62	111.81	3.7983	***
reg	1	0.19	0.19	0.0064	
var x acucar	1	1.02	1.02	0.0347	
var x dose	2	23.04	11.52	0.3914	
açúcar x dose	2	63.29	31.65	1.0750	
var x reg	1	0.02	0.02	0.0007	
acuca r xreg	1	9.19	9.19	0.3121	
dose x reg	2	7.88	3.94	0.1338	
var x açúcar x dose	2	4.04	2.02	0.0686	
var x açúcar x reg	1	1.69	1.69	0.0573	
var x dose x reg	2	0.29	0.15	0.0050	
açúcar x dose x reg	2	30.88	15.44	0.5244	
var x açúcar x dose x reg	2	1.63	0.81	0.0276	
Resíduo	24	706.50	29.44		

*** Significativo a 5%.