

EMANUELLE FERREIRA MELO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CANA-DE-AÇÚCAR E ASPECTOS
MORFOANATÔMICOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M528e
2011

Melo, Emanuelle Ferreira, 1982-

Embriogênese somática em cana-de-açúcar e aspectos morfoanatômicos / Emanuelle Ferreira Melo. – Viçosa, MG, 2011.

xi, 62f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 50-59

1. *Saccharum*. 2. Tecidos (Anatomia e fisiologia) - Cultura e meios de cultura. 3. Botânica. 4. Plantas – Anatomia.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.61

EMANUELLE FERREIRA MELO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CANA-DE-AÇÚCAR E ASPECTOS
MORFOANATÔMICOS**

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

APROVADA: 19 de dezembro 2011.

Aurora Yoshiko Sato

Mychelle Carvalho

Wagner Campos Otoni

Luiz Alexandre Peternelli

Prof. Márcio Henrique Pereira Barbosa
(Orientador)

Ao meu querido pai, Manoel Messias Melo (saudades eternas),

Ofereço

A minha mãe Ivonete e minha irmã Lílian, por serem os alicerces da minha vida,

Ao meu amor Daniel Vieira de Pinho,

Com carinho dedico.

*“Quando estiver em dificuldade, e pensar em desistir: lembre-se dos obstáculos
que já superou - olhe para trás.
Se tropeçar e cair, levante. Não fique prostrado: esqueça o passado - olhe para
frente.
Ao sentir-se orgulhoso, por alguma realização pessoal: sonde suas
motivações - olhe para dentro.
Antes que o egoísmo o domine, enquanto seu coração é sensível, socorra os
que o cercam - olhe para os lados.
Na escalada, rumo às altas posições, no afã de concretizar seus sonhos,
observe se não está pisando em alguém - olhe para baixo.
Em todos os momentos da vida, seja qual for sua atividade, busque a
aprovação de Deus - olhe para cima!
Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem, você continuará vivendo, mas terá
deixado de existir”.*
Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, proteção e por estar ao meu lado em todos os momentos.

A minha mãe Ivonete e minha irmã Lílian pelo amor incondicional, dedicação e incentivo sempre.

Aos meus irmãos, Erik e Elder, e a toda a minha família, por tudo.

Ao meu namorado Daniel Vieira de Pinho por todo apoio, carinho e paciência.

A minha amiga-irmã Suerlani pela amizade, apoio e por estar sempre ao meu lado.

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

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Edgard Augusto de Toledo Picoli pela co-orientação, disponibilidade e paciência.

Aos professores Wagner Campos Otoni e Luiz Alexandre Peternelli pela disponibilidade e valiosas sugestões.

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

A Aurora Sato e Mychelle Carvalho pela participação na banca de defesa e contribuições.

Às grandes amigas Cristiane, Rachel e Caroline por toda a ajuda nos experimentos, apoio, dedicação e amizade.

Às companheiras de república e amigas Elizabeth e Ana Cristina pelos bons momentos vividos.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais (LCTCV), Márcio Rocha e Cenira pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Aos amigos do LCTCV, Elisa, Vanessa e Marconi por toda a ajuda e agradável convivência.

Ao Victor e Elisa pela grande ajuda nos trabalhos de anatomia vegetal.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da UFV, que contribuíram para meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV e as suas agências financiadoras (FINEP, FAPEMIG e CNPq).

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

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

EMANUELLE FERREIRA MELO, filha de Manoel Messias Melo e Maria Ivonete Ferreira Melo, nasceu em Montes Claros, Minas Gerais, em 12 de maio de 1982.

Em dezembro de 1999 concluiu o Curso Técnico em Agropecuária, no Núcleo de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Montes Claros, MG.

Em junho de 2006 graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), e em agosto do mesmo ano iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal nesta mesma Universidade.

Em agosto de 2008 iniciou o curso de Doutorado em Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, concluindo os requisitos necessários para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*, no dia 19 de dezembro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 A cultura da cana-de-açúcar	2
2.2 Cultivo in vitro de cana-de-açúcar	4
2.3 Embriogênese somática	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Desinfestação e preparo dos explantes	9
3.2 Indução da embriogênese somática.....	13
3.3 Teste histoquímico para detecção de culturas embriogênicas	13
3.4 Multiplicação dos calos embriogênicos.....	14
3.5 Maturação dos embriões somáticos.....	14
3.6 Regeneração dos embriões somáticos	15
3.7 Aclimatização das plantas.....	15
3.8 Estudos Anatômicos.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Indução da embriogênese somática.....	18
4.2 Multiplicação de calos embriogênicos	26
4.3 Maturação e regeneração dos embriões somáticos	28
4.4 Indução da embriogênese somática nas cultivares RB855536 e RB92579.....	31
4.5 Microscopia de luz	35
4.6 Microscopia eletrônica de varredura	45
5. CONCLUSÕES	49
6. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXO	60

RESUMO

MELO, Emanuelle Ferreira. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2011. **Embriogênese somática em cana-de-açúcar e aspectos morfoanatômicos.** Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Coorientadores: Edgard Augusto de Toledo Picoli e Marília Contin Ventrella.

O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos de diferentes tipos de explantes e reguladores de crescimento nas diferentes fases da embriogênese somática de cana-de-açúcar, cultivar RB867515 e caracterizar anatomicamente as fases deste processo nesta cultivar. Além disso, foi avaliada a regeneração *in vitro*, via embriogênese somática, nas cultivares RB855536 e RB92579. Na primeira etapa do trabalho foram avaliados o uso de dois tipos de explantes iniciais: folhas imaturas e ápices caulinares na indução da embriogênese somática da cultivar RB867515, através da utilização das auxinas (2,4-D, picloram ou dicamba) nas concentrações (2, 4, 6, e 8 mg.L⁻¹). Os calos embriogênicos primários formados no meio de indução foram transferidos para diferentes meio de multiplicação com a mesma composição do meio de indução (tipo de regulador e concentração), que foi definida de acordo com o regulador que apresentou a maior porcentagem de formação de calos embriogênicos. Acrescido de 4 mg.L⁻¹ do ácido indol-3-acético (AIA), 100 mg.L⁻¹ de L-asparagina e a combinação destes dois. Para a etapa de maturação dos embriões somáticos foram testados os efeitos da concentração de sacarose (30 e 60 g.L⁻¹) e do agente solidificante fitagel (2,5 e 5,0 g.L⁻¹), acrescidos ao meio MS. Para a conversão dos embriões somáticos em plantas foram testados dois tipos de meio de regeneração: meio MS basal e também o meio MS suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de GA₃. A porcentagem de conversão de embriões somáticos em plantas foi quantificada, de acordo com o meio de maturação utilizado, após 30 dias de cultivo. Para a caracterização anatômica do processo de embriogênese somática a partir de tecidos foliares e ápices caulinares foi empregada a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de varredura. O processo de regeneração *in vitro* via embriogênese somática nas cultivares RB855536 e RB92579, foi realizado a partir do tipo de explante que melhor respondeu ao processo embriogênico na cultivar RB867515. Foram também utilizados os melhores tratamentos observados nessa cultivar, para todas as

etapas do processo embriogênico. O 2,4-D na concentração de 2 mg.L^{-1} foi a auxina mais eficiente na indução de calos embriogênicos em cana-de-açúcar, para os dois tipos de explantes utilizados. O uso de ápices caulinares como explantes iniciais permitiu uma maior produção de calos embriogênicos (72%), se comparado ao uso de folhas imaturas (59%), na concentração de 2 mg.L^{-1} . Embriões somáticos de cana-de-açúcar, com uma alta taxa de regeneração em plantas, foram obtidos com a adição de 60 g.L^{-1} de sacarose e $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de fitagel. Os diferentes explantes não diferiram entre si, quanto a sua capacidade de conversão de embriões somáticos em plantas. Os estudos anatômicos na cultivar RB867515, permitiram a caracterização do processo de embriogênese somática e a confirmação desta via de regeneração. A cultivar RB867515 apresentou maior porcentagem de formação de calos embriogênicos e conversão de embriões somáticos em plantas, do que as cultivares RB855536 e RB92579. Sendo que, essas duas últimas cultivares não diferiram entre si quanto a sua capacidade de formação de calos embriogênicos, multiplicação e conversão de embriões somáticos em plantas. Foi possível a regeneração de plantas de cana-de-açúcar via embriogênese somática para as cultivares de RB867515, RB855536 e RB92579, num período de 150 dias após a inoculação dos explantes.

ABSTRACT

MELO, Emanuelle Ferreira. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2011. **Somatic embryogenesis in sugarcane and morphoanatomical aspects.** Adviser: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Co-advisers: Edgard Augusto de Toledo Picoli and Marília Contin Ventrella.

This study was carried out to evaluate the effects of the different explants types and growth regulators at different phases of the somatic embryogenesis in sugarcane, RB867515 cv., as well as to anatomically characterize the phases of this process in this cultivar. In addition, the *in vitro* regeneration was evaluated via somatic embryogenesis in cultivars RB855536 and RB92579. In the first stage of the work, the use of two types of the initial explants were evaluated: immature leaves and shoot tips in the induction of the somatic embryogenesis of the cultivar RB867515, by using the auxins (2,4-D, picloram or dicamba) at concentrations (2, 4, 6, and 8 mg.L⁻¹). The primary embryonic calluses formed during induction were transferred to different multiplication media, as maintaining the same composition of the induction medium (regulator type and concentration), that was defined according to the regulator presenting the highest percent formation of embryonic calluses, as being added 4 mg.L⁻¹ of the indol-3-acetic acid (AIA), 100mg.L⁻¹ of L-asparagine and the combination of those two. For the maturation stage of the somatic embryos, the effects of either sucrose concentration (30 and 60 g.L⁻¹) and solidifying agent so-called phytigel (2.5 and 5.0 g.L⁻¹) added to MS medium were tested. For conversion of the somatic embryos in plants, two types of the regeneration medium were tested: basal MS medium and also the MS medium supplemented with 1mg.L⁻¹ of BAP and 1mg.L⁻¹ of GA₃. After 30-days culture, the percent conversion of the somatic embryos in plants were quantified according to the used maturation medium. For the anatomical characterization of the somatic embryogenesis process from the leaf tissues and shoot tips, the light microscopy and scanning electron microscopy were used. The *in vitro* regeneration process through somatic embryogenesis in the cultivars RB855536 and RB92579 were accomplished from the explant type showing the best response to embryogenic process in the cultivar RB867515. The best treatments observed in this cultivar were also used in all stages of the embryogenic process. The 2,4-D at concentration of 2 mg.L⁻¹ was the most

efficient auxin in inducing the embryogenic calluses in sugarcane, for both types of the explants used. The use of shoot tips as initial explants made possible a higher production of the embryogenic calluses (72%), when compared to the use of immature leaves (59%) at the concentration of 2 mg.L^{-1} . Somatic sugarcane embryos, with high regeneration rate in plants, were obtained with the addition of 60 g.L^{-1} of sucrose and 5.0 g.L^{-1} of phytagel. The different explants did not differ among themselves, as for their ability to convert the somatic embryos into plants. In the cultivar RB867515, the anatomical studies turned possible the characterization of the somatic embryogenesis and the confirmation of this regeneration way. The cultivar RB867515 showed higher percent formation of embryogenic calluses and the conversion of somatic embryos into plants than the cultivars RB855536 and RB92579. Those two cultivars did not differ in relation to the ability to form embryogenic calluses, multiplication and conversion of somatic embryos into plants. For the cultivars RB867515, RB855536 and RB92579, the regeneration of sugarcane plants were possible through somatic embryogenesis during 150-days period after inoculation of the explants.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e etanol produzidos a partir da cana-de-açúcar, bem como o maior exportador destes produtos. A cultura da cana-de-açúcar apresenta grande importância econômica, pois é fonte de matéria-prima para a produção de açúcar, etanol e biomassa para a alimentação animal, destacando-se como uma das principais culturas agrícolas do país. Além disso, há a geração de subprodutos nas usinas de açúcar e álcool, como a vinhaça, torta de filtro e o bagaço que a partir da sua queima permite a co-geração de energia elétrica.

A crescente preocupação com o aumento do aquecimento global levou ao desenvolvimento de tecnologias alternativas e sustentáveis, que diminuam a emissão de gases poluentes e, neste sentido, a cana-de-açúcar destaca-se como uma opção de energia renovável e alternativa ao uso de combustíveis derivados do petróleo.

Devido ao seu destaque e importância na economia mundial, a cultura da cana-de-açúcar está inserida em programas de melhoramento genético, visando à introdução de características de interesse agrônomo, como a produtividade elevada, aumento no teor de sacarose, tolerância às principais pragas e patógenos e tolerância a herbicidas, sendo que, nestes programas, a transformação genética é uma importante ferramenta para a obtenção de variedades agronomicamente superiores.

Os avanços nas áreas de cultura de tecidos, biologia molecular e engenharia genética, têm proporcionado o desenvolvimento de novas plantas com características agrônomicas desejáveis, através da transformação genética. A cana-de-açúcar apresenta características que a tornam uma excelente cultura para o melhoramento através da transformação, pois possui facilidade para a regeneração de plantas a partir do cultivo de calos *in vitro* e também possibilita a multiplicação do material vegetal por meio da micropropagação.

Uma via de regeneração comumente utilizada na obtenção de plantas transformadas é a embriogênese somática. Neste caso, as células somáticas se diferenciam em embriões somáticos, seguindo etapas semelhantes às da embriogênese zigótica. A utilização da embriogênese somática permite altas taxas de multiplicação do material vegetal, além disso, os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com elevada uniformidade e estabilidade. O desenvolvimento de um eficiente protocolo de embriogênese somática é importante por permitir condições para que seja realizada a transformação genética.

Em cana-de-açúcar, a obtenção da embriogênese somática geralmente se dá através do cultivo de segmentos foliares imaturos em meio de cultura contendo diferentes auxinas, como o 2,4-D ou picloram. Entretanto, como a resposta morfogênica é genótipo-dependente, é fundamental que seja realizada a adaptação de protocolos para cada cultivar a ser utilizada.

Devido à importância que a cultura da cana-de-açúcar representa para o Brasil e o mundo, torna-se necessária a busca de alternativas para o seu melhoramento genético, principalmente no que se diz respeito ao melhor entendimento do processo de embriogênese somática e regeneração de plantas *in vitro*, pois estas técnicas formam a base para uma efetiva exploração da tecnologia dos transgênicos.

O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos de diferentes tipos de explantes e reguladores de crescimento nas diferentes fases da embriogênese somática de cana-de-açúcar, cultivar RB867515 e caracterizar anatomicamente as diferentes fases do processo embriogênico nesta cultivar. Além disso, foi avaliado o processo de regeneração *in vitro* via embriogênese somática nas cultivares RB855536 e RB92579.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta alógama pertencente à família Poaceae. Ela é originária do Sudeste Asiático, entre as regiões da Indonésia e Nova Guiné. A cana pertence ao gênero *Saccharum* e neste gênero há seis espécies descritas: *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barbieri* e *S. edule* (Daniels e Roach, 1987).

As atuais cultivares de cana-de-açúcar são plantas altamente poliplóides e resultado de hibridizações interespecíficas envolvendo as espécies *S. officinarum* L. ($2n = 80$ cromossomos), a qual contribui com um alto teor de sacarose e *S. spontaneum* L. ($2n = 40 - 128$ cromossomos) responsável pelo vigor vegetativo e resistência a estresses bióticos e abióticos (Ming et al., 2001).

O Brasil destaca-se como líder mundial na produção de açúcar e álcool de cana, e também como o maior exportador destes produtos. De acordo com estimativas da safra

2011/2012 fornecidas pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), a área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em 8.434,3 milhões de hectares, distribuídos em todos estados produtores. São Paulo destaca-se como o maior estado produtor de cana-de-açúcar, seguido por Minas Gerais, responsável por 9,0% da produção nacional (759,21 milhões de hectares). A previsão do total de cana moída na safra 2011/12 é de 588,915 milhões de toneladas, sendo que deste total, 288,287 milhões de toneladas serão empregadas na produção de açúcar (48,95% da produção total).

Atualmente, aproximadamente 58% da área cultivada com cana-de-açúcar no país contém cultivares desenvolvidas pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA, que é composta por dez universidades federais, incluindo a Universidade Federal de Viçosa.

As cultivares RB867515, RB855536 e RB92579 foram desenvolvidas pelas seguintes universidades: Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e Universidade Federal de Alagoas (UFAL), respectivamente. Essas cultivares apresentam uma alta produção agrícola, alto teor de sacarose e tolerância às principais doenças de importância econômica na cultura.

A importância que a cultura da cana-de-açúcar representa, tanto no cenário nacional quanto no internacional, trás inúmeros benefícios para o país. Apesar da grande relevância da produção de açúcar, o principal responsável pela crescente projeção da cultura é a produção do etanol.

A preocupação mundial com o abastecimento energético para os meios de transporte e a necessidade de se reduzir as emissões de dióxido de carbono (CO₂), através da utilização de uma fonte de energia mais limpa e que seja uma alternativa ao uso do petróleo e seus derivados, faz do etanol uma excelente opção. Além disso, o crescimento da frota de veículos flex e a valorização deste combustível no mercado internacional, aumentaram a demanda interna de álcool e impulsionaram o crescimento do setor sucroalcooleiro nacional.

Neste contexto, uma abordagem integrada combinando estratégias de melhoramento convencional e molecular podem permitir à indústria da cana-de-açúcar em todo o mundo enfrentar os desafios do futuro (Lakshmanan et al., 2005).

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

Desde 1960, década em que começaram os estudos em biotecnologia na cana-de-açúcar, a cultura de células e tecidos *in vitro* tem se mostrado uma ferramenta útil para diversas atividades de pesquisa.

Os estudos iniciais realizados por Nickell (1964), Heinz e Mee (1969) e Barba e Nickell (1969), levaram a exploração das técnicas de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar a diversas abordagens, como a micropropagação de plantas (Behera e Sahoo, 2009; Pandey et al., 2011), a conservação de germoplasma (Lemos et al., 2002; Sarwar e Siddiqui et al., 2004; Watt et al., 2009; Chandran, 2010), a variação somaclonal (Singh et al., 2008; Badawy et al., 2008; Shahid et al., 2011; Shomeili et al., 2011), a embriogênese somática (Mittal et al., 2009; Suprasanna et al., 2010; Basnayake et al., 2011) e a transformação de plantas (Arencibia et al., 1999; Manickavasagam et al., 2004; Molinari et al., 2007).

A regeneração de plantas de cana-de-açúcar através do cultivo *in vitro* pode ocorrer através de duas rotas morfogênicas: a organogênese e a embriogênese somática.

Na organogênese ocorre a regeneração do material vegetal diretamente a partir de meristemas apicais ou de segmentos foliares imaturos (Lakshmanan et al., 2006; Snyman et al., 2006; Khan et al., 2008; Pathak et al., 2009). Já no processo de embriogênese somática, as células somáticas cultivadas *in vitro* são induzidas a formar embriões, que podem ser obtidos segundo dois padrões de desenvolvimento: o direto, sem que ocorra a formação de um estágio intermediário de calos (Watt et al., 2009; Suprasanna et al., 2010) e o indireto, com a formação de calos (Wamaitha et al., 2010; Basnayake et al., 2011).

A embriogênese somática é importante, pois além de permitir a multiplicação de genótipos superiores, pode ser uma ferramenta bastante útil para estudos de processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos dos sistemas vegetais, e por permitir a regeneração de plantas geneticamente transformadas (Guerra et al., 1999).

2.3 Embriogênese somática

A embriogênese somática é a produção de embriões a partir de uma célula isolada ou um pequeno grupo de células que, por meio do cultivo *in vitro* darão origem a embriões

somáticos. Neste caso, estruturas semelhantes a embriões zigóticos se desenvolvem a partir de células somáticas, seguindo uma sequência de estádios característicos da embriogênese zigótica, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Jimenez, 2001).

Segundo Guerra et al. (1999), uma característica marcante dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial. Esta característica aliada a sua bipolaridade (presença de ápices caulinar e radicular), permite a distinção entre os processos de embriogênese e organogênese (Falco et al., 1996).

A utilização da embriogênese somática apresenta diversas vantagens, como: alta taxa de multiplicação do material vegetal, obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos) e produção de forma sincronizada, com alto grau de uniformidade. A embriogênese pode também ser utilizada como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento genético, em especial quando associada às técnicas de transformação de plantas e engenharia genética (Guerra et al., 1999). Para Marcano et al. (2002), a embriogênese oferece muitos benefícios a cultura da cana-de-açúcar, particularmente no que diz respeito à introdução de genes de interesse, a produção massiva de embriões somáticos utilizados para a transformação genética e a produção de sementes sintéticas ou artificiais.

De acordo com Suprasanna et al. (2005), o emprego da embriogênese somática na cultura da cana-de-açúcar tem dois objetivos principais: o desenvolvimento de um método reprodutível para a propagação rápida de plantas e a obtenção de um eficiente sistema de regeneração de embriões somáticos utilizados para a transformação genética. No entanto, ainda de acordo com os mesmos autores, a criação de um sistema de produção de calos embriogênicos em grande escala, o estabelecimento de culturas embriogênicas em genótipos diferentes, a manutenção das culturas a longo prazo, com uma boa taxa de regeneração e o controle da variação somaclonal, continuam a ser um desafio.

No processo de embriogênese somática podem ser observados dois padrões básicos de desenvolvimento: um modelo direto, chamado embriogênese somática direta (ESD) no qual os embriões somáticos originam-se a partir dos tecidos matrizes sem a formação do estágio intermediário de calos e um modelo indireto, ou embriogênese somática indireta (ESI), onde há formação de um tecido intermediário, o calo, o qual apresenta células em diversos estádios de diferenciação e, conseqüentemente com diferentes graus de determinação, que podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (Guerra et al., 1999).

Em cana-de-açúcar, vários trabalhos têm relatado o emprego da embriogênese somática, seja através de modelos diretos (Desai et al., 2004; Snyman et al., 2006, 2011; Shah et al., 2009; Watt et al., 2009), indiretos (Mittal et al., 2009; Kaur e Gosal, 2009), ou através da comparação dos dois modelos (Ali et al., 2007; Suprasanna et al., 2010; Van Der Vyver, 2010).

Estudando o processo de transformação e regeneração de plantas pelo método do bombardeamento de partículas, Van Der Vyver (2010), utilizou embriões de cana-de-açúcar produzidos via ESD e ESI. As duas rotas de desenvolvimento estudadas possibilitaram a regeneração de embriões somáticos, expressando o gene repórter GFP (green fluorescent protein).

Segundo Steiner et al. (2008), o processo de embriogênese somática pode ser dividido em dois ciclos básicos: o ciclo de indução e multiplicação das culturas embriogênicas e o ciclo de maturação, onde serão obtidos embriões somáticos maduros, passíveis de regeneração.

A etapa de indução de calos embriogênicos é um dos passos principais no processo de embriogênese somática. Esta etapa inicial é considerada crítica, pois nesta fase são estabelecidas a polaridade e a camada protodérmica (Bozhkov et al., 2002). Vários são os fatores que afetam este processo, dentre eles destacam-se o tipo, estágio de desenvolvimento e fonte do explante inicial, composição do meio de cultura e o balanço hormonal estabelecido, além do genótipo da planta matriz (Guerra et al., 1999; Jiménez, 2001).

Nos últimos anos, vários protocolos foram estabelecidos para a regeneração de plantas via embriogênese somática indireta em cana-de-açúcar, por meio da utilização de diferentes tipos de explantes e reguladores de crescimento (Tabela 1).

Tabela 1. Regeneração de plantas via embriogênese somática indireta em cana-de-açúcar.

Tipo de explante	Regulador de crescimento	Concentração (mg.L ⁻¹)	Genótipos	Referências
Folhas imaturas	2,4-D	3	16 cultivares diferentes	Basnayake et al., 2011
		2,2	SP-803280	Macedo, 2010
		2; 4; 8	RB872552	Silva, 2010
		3	SP-241	Asad et al., 2009
		3	CP52-43	Nieves et al., 2008
		3	GT 54-9, NCo 310 e Co 413	Badawy et al., 2008
		2	JA-605 e C-8751	Linacero et al., 2001
		3	SP-701143 e SP-791011	Falco et al., 1996
		1; 3; 6 e 9	RB855536, RB928064 e RB835486	Heerdt, 2008
		2,4-D, Dicamba e CPA	1,1; 2,2; 3,3 e 4,4	RB867515, RB928064 e RB925345
2,4-D + cinetina	3 + 0,1	RB835486	De Jesus, 2010	
2,4-D + BAP	4 + 0,5	CoJ 64, CoJ83 e CoJ 86	Kaur e Gosal, 2009	
Inflorescências imaturas	2,4-D + ANA	5; 10; 20; 40 e 50 + 1	<i>Saccharum edule</i>	Chandran, 2011
	2,4-D	1	Co-91010 e CoC-671	Suprasanna et al., 2005
	2,4-D	3	CP-5243	Nieves et al., 2003
Meristemas apicais	2,4-D	2	NiF8	Wamaitha et al., 2010
	2,4-D	3	IJ76-316	Ahloowalia e Marezki, 1983
Ápices caulinares	2,4-D + cinetina	4 + 0,5	CoJ 64, CoJ 83 e CoJ 88	Mittal et al., 2009
	2,4-D	5	RB739735, RB758540 e Chunnee	Cidade et al., 2006

Diversos tipos de explantes iniciais têm sido empregados no processo embriogênico em cana de açúcar. De acordo com Lakshmanan (2006), praticamente todas as partes da planta produzem calos embriogênicos, porém, as folhas imaturas (Chengalrayan & Gallo-Meagher, 2001; Lakshmanan et al., 2006 Snyman et al., 2011) e inflorescências em desenvolvimento (Gallo-Meagher et al., 2000; Desai et al., 2004), são muito prolíficos, portanto, são os tecidos-alvos preferidos para uma produção rápida de calos embriogênicos. A

utilização de ápices caulinares tem sido pouco relatada na literatura, portanto, o uso deste tipo de explante, pode ser uma alternativa no processo de indução, formação de embriões somáticos e regeneração de plantas.

A iniciação da embriogênese somática se dá através da adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura e, dentre estes, as auxinas destacam-se como a classe de reguladores de crescimento mais utilizadas no processo embriogênico (Cooke et al., 1993). Como pode ser observado na tabela 1, o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é o regulador de crescimento mais empregado no processo de indução de embriogênese somática em cana-de-açúcar.

Entretanto, há relatos de indução de calos embriogênicos em meio suplementado com outras auxinas, como por exemplo, o picloram - ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Fitch e Moore, 1990; Irvine et al, 1991; Chengalrayan et al., 2005) e o dicamba - ácido 3,6-dicloroanísico (Brisibe et al., 1994; Ramos, 2011).

Goel et al. (2010) testaram diferentes tipos (2,4-D, ANA - ácido naftalenoacético e AIB - ácido indolbutírico) e concentrações (1, 2, 3 e 4 mg.L⁻¹) de auxinas na produção de calos embriogênicos em cana-de-açúcar. Eles observaram que a porcentagem de formação de calos embriogênicos foi influenciada pelo tipo e concentração da auxina e que a frequência de formação de calos em meio acrescido com ANA e AIB foi significativamente menor do que a obtida com o 2,4-D.

Além do uso das auxinas, são também encontradas associações entre auxinas e citocininas no processo de indução de embriogênese em cana-de-açúcar, como por exemplo o uso de 2,4-D + Cinetina (Sinha et al., 2000; Gill et al., 2004; Mittal et al., 2009) e 2,4-D + BAP - benzilaminopurina (Geetha e Padmanabhan, 2001; Kaur e Gossal, 2009).

Um outro fator que afeta a resposta embriogênica da cana-de-açúcar é o genótipo empregado. A utilização de um determinado genótipo depende da sua capacidade de formação de calos embriogênicos e a sua regeneração em plantas. Segundo Gandonou et al. (2005), a capacidade de produção de calos embriogênicos é genótipo-dependente.

A conversão dos embriões somáticos em plantas é a fase final do processo de embriogênese somática. A regeneração geralmente ocorre em meio desprovido de reguladores de crescimento e na presença da luz (Garcia et al., 2007; Watt et al., 2009; Suprasanna et al., 2010; Van Der Vyver et al., 2010; Basnayake et al., 2011), porém, este processo pode ser potencializado pela utilização de diferentes reguladores (Ali et al., 2008; Nieves et al., 2008; Kaur e Gosal, 2009; Goel et al., 2010; Wamaitha et al., 2010).

A caracterização anatômica da embriogênese somática em cana-de-açúcar, nas suas diferentes fases é importante, pois permite o entendimento e a confirmação desse processo. No processo morfogênico, duas vias de regeneração podem ocorrer, a organogênese e a embriogênese somática, portanto o estudo anatômico do material vegetal possibilita a distinção do processo embriogênico da organogênese (Ho e Vasil, 1983 a, b; Falco et al., 1996; Ramos, 2011). No entanto, como a resposta morfogênica é genótipo-dependente, são necessárias adaptações de metodologias de acordo com os genótipos utilizados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios: de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia, de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal e no Núcleo de Microscopia e Microanálise localizados na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

3.1 Desinfestação e preparo dos explantes

3.1.1 Estudo de diferentes tipos de explantes iniciais na indução da embriogênese somática da cultivar RB867515

Para o estudo de diferentes tipos de explante inicial na indução da embriogênese somática foram utilizados dois tipos de explantes: folhas imaturas de material proveniente do campo e ápices caulinares de material já estabelecido em laboratório.

3.1.1.1 Fonte de explantes: Folhas imaturas

Para o estabelecimento *in vitro*, foram utilizadas ponteiras de aproximadamente 50 cm de comprimento. Elas foram coletadas de plantas com aproximadamente 10 meses de idade, na Estação Experimental do Aeroporto da UFV.

O preparo e desinfestação do material vegetal foi realizado segundo Melo et al. (2011), com modificações. Após a coleta, as folhas mais externas das ponteiras foram eliminadas uma a uma até a visualização do último nó. As ponteiras foram reduzidas a palmitos com aproximadamente 8,0 cm de comprimento e 1,0 cm de diâmetro, sendo estes mantidos em água deionizada, para evitar a desidratação até o início da desinfestação. Posteriormente, os palmitos foram pré-desinfestados em água com detergente na concentração 1:1 durante 10 minutos, e em seguida 10 minutos em Agrimaicin*-500 (4 g.L⁻¹). Após essas duas etapas o material vegetal foi lavado em água deionizada por três vezes. Em seguida os palmitos foram imersos por 20 minutos em água sanitária comercial (2,0 a 2,5% de cloro ativo) diluída em água deionizada na concentração 1:1, e então lavados em água deionizada autoclavada por três vezes. Logo após a pré-desinfestação, foram extraídos dois pares de folhas de cada explante.

Os explantes foram então levados para câmara de fluxo laminar e desinfestados em álcool 70% (v/v) durante 1 minuto e após este período foram mantidos em água sanitária comercial (2,0 a 2,5% de cloro ativo) durante 20 minutos, acrescida de 3 gotas do agente surfactante Tween-20[®]. Entre cada etapa, os explantes foram enxaguados três vezes com água deionizada autoclavada.

Após a desinfestação, os explantes foram reduzidos a cilindros de folhas imaturas de 2 mm de diâmetro e cortados transversalmente em segmentos de 2-3 mm, sendo então incubados em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, 15 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico e solidificado com 2,5% de fitagel. Em cada placa de Petri foram inoculados 6 explantes. Foram ainda acrescidos ao meio os reguladores de crescimento correspondentes a cada tratamento.

3.1.1.2 Fonte de explantes: ápices caulinares

Após a coleta do material vegetal e a desinfestação, descritas anteriormente, os explantes foram reduzidos a 10 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro e inoculados individualmente em tubos de ensaios de dimensão 25 x 150 mm com tampa de polipropileno. Cada tubo contendo 10 ml de meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, 15 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, solidificado com 7,0 g.L⁻¹ de ágar, 0,25 mg.L⁻¹ de cinetina, e 0,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). Os explantes foram incubados em sala com temperatura controlada de 27 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas de luz, e irradiância de ± 52 μmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram, luz do dia, 40 W).

Após 21 dias, os explantes foram transferidos para frascos de 350 ml (1 explante/frasco) com tampas de polipropileno, contendo 30 mL do mesmo meio utilizado anteriormente. As plantas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente e repicadas a cada 21 dias. Foram necessárias três repicagens até a obtenção do material necessário para realização dos experimentos. Os ápices caulinares, formados pelo meristema apical e três a cinco primórdios foliares adjacentes (diâmetro de aproximadamente 1-2 mm), foram excisados e estabelecidos em placas de Petri (6 explantes/placa) com meio MS acrescido dos reguladores de crescimento correspondentes a cada tratamento.

As análises estatísticas dos parâmetros avaliados foram realizadas utilizando-se o programa SISVAR (Ferreira, 1999). Foi realizada a análise de variância, seguida de análise de regressão e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As etapas do processo de obtenção dos diferentes tipos de explantes utilizados na indução da embriogênese somática de cana-de-açúcar estão esquematizadas na Figura 1.

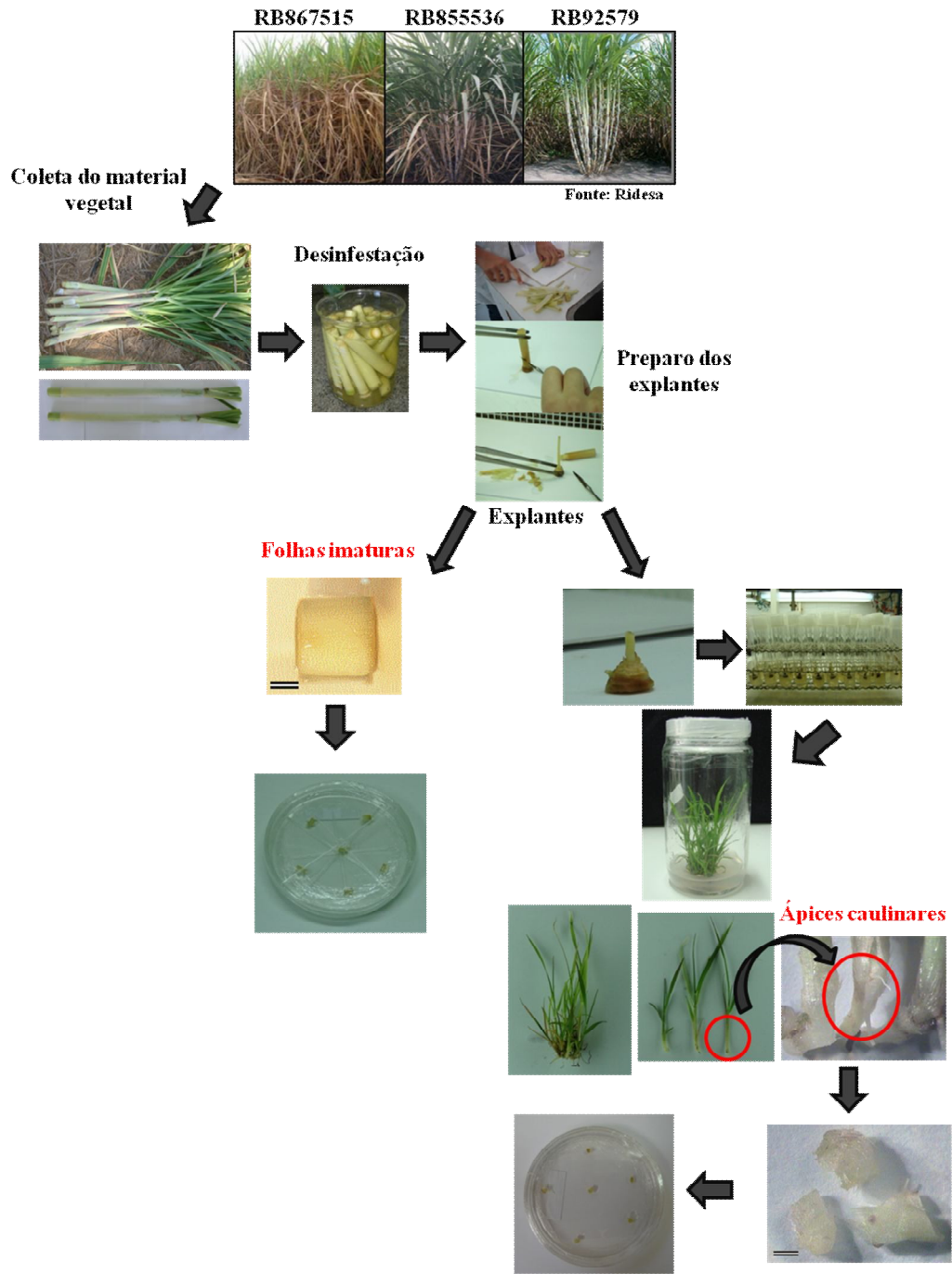


Figura 1. Esquema representativo dos diferentes explantes utilizados na indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar. Barras: 1 mm.

3.2 Indução da embriogênese somática

Para a indução de calos e do processo de embriogênese somática foram utilizadas três diferentes auxinas 2,4-D, Picloram e Dicamba nas concentrações de 2, 4, 6 e 8 mg.L⁻¹ mais o controle, sem a adição de auxinas. A unidade experimental correspondeu a uma placa de Petri composta de seis explantes. As placas foram mantidas no escuro em sala de crescimento com temperatura controlada 27±2°C durante 60 dias.

O experimento foi instalado no delineamento em blocos casualizados (DBC), segundo o esquema fatorial 3x4, composto de quatro blocos. Os blocos consistiram nos quatro dias em que os experimentos foram implantados. Os calos foram observados diariamente em lupa estereoscópica.

Após 30 dias em meio de indução foi avaliada a porcentagem de calos formados nos diferentes tratamentos e, após esta avaliação, os calos foram transferidos para um meio de cultura novo, contendo a mesma concentração de reguladores de crescimento utilizada anteriormente. Decorridos mais 30 dias após essa transferência, foi avaliada a porcentagem de calos embriogênicos formados em cada tratamento.

3.3 Teste histoquímico para detecção de culturas embriogênicas

Além da análise visual, para a diferenciação de calos embriogênicos e não embriogênicos foi realizado ainda o teste histoquímico através da dupla coloração com os corantes azul de Evans e carmim acético (Durzan, 1988), para confirmação da presença de células embriogênicas na massa de calos. Para tanto, foram coletadas amostras constituídas de 100 mg de calos, as quais foram adicionadas 2 gotas do corante azul de Evans (0,1% p/v) por 2 a 3 minutos em uma lâmina de microscopia ótica. Após este período, foi retirado o excesso do azul de Evans e foram adicionadas 2 gotas do corante carmim acético (2% p/v) pelo mesmo período de tempo. O excesso de corante foi retirado e em seguida adicionadas de uma a duas gotas de água. As amostras foram cobertas com uma lamínula, e as lâminas prontas receberam leves batidas com um bastão de vidro, para espalhar o material. As observações e

documentações deste material foram realizadas em fotomicroscópio (Olympus AX70) equipado com sistema U-photo.

3.4 Multiplicação dos calos embriogênicos

Para a multiplicação dos calos embriogênicos, foi utilizada a mesma composição do meio de indução (tipo de regulador e concentração), que foi definida de acordo com o regulador que apresentou uma maior porcentagem de formação de calos embriogênicos. Neste meio foi acrescido ainda 4 mg.L^{-1} do ácido indol-3-acético (AIA), 100 mg.L^{-1} de L-asparagina e a combinação destes dois. Os calos embriogênicos foram cultivados em placas de Petri e mantidos no escuro em sala de crescimento com temperatura controlada de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

O delineamento utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC) composto de doze repetições (placas) por tratamento. O crescimento dos calos foi quantificado através da diferença do peso final dos calos embriogênicos após 30 dias em meio de multiplicação pelo peso inicial dos mesmos, avaliado em balança de precisão. Após este período os calos embriogênicos foram transferidos para a etapa de maturação dos embriões.

3.5 Maturação dos embriões somáticos

Nesta etapa foram testados os efeitos da concentração de sacarose (30 e 60 g.L^{-1}) e do agente solidificante fitagel ($2,5$ e $5,0 \text{ g.L}^{-1}$), acrescidos ao meio MS + $5 \text{ }\mu\text{M}$ de ácido abscísico (ABA) para a maturação dos embriões somáticos. Os embriões somáticos foram cultivados em placas de Petri e mantidos no escuro em sala de crescimento com temperatura controlada $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

O delineamento utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC), segundo o esquema fatorial 2×2 , composto de doze repetições (placas) por tratamento. Após 30 dias de cultivo os embriões somáticos maturados foram transferidos para o meio de regeneração.

3.6 Regeneração dos embriões somáticos

Para obter a regeneração dos embriões somáticos maduros foram testados dois tipos de meio de regeneração: meio MS basal e também o meio MS suplementado com 1 mg.L^{-1} de BAP e 1 mg.L^{-1} de GA_3 . As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas de escuro, com irradiância de $30 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, obtida com lâmpadas fluorescentes de 40 W Osram®. A porcentagem de embriões somáticos regenerados foi quantificada, de acordo com o meio de maturação utilizado, após 30 dias de cultivo.

Os embriões que se regeneraram em plântulas foram transferidos para frascos, contendo o mesmo meio de cultivo MS, para um melhor desenvolvimento, permanecendo nestes por mais 30 dias.

3.7 Aclimatização das plantas

As plantas obtidas foram transferidas para tubetes e mantidas em câmara de nebulização por 15 dias. Após este período as plantas foram transplantadas para vasos e levadas para casa-de-vegetação.

As etapas do processo de embriogênese somática estão esquematizadas na Figura 2.

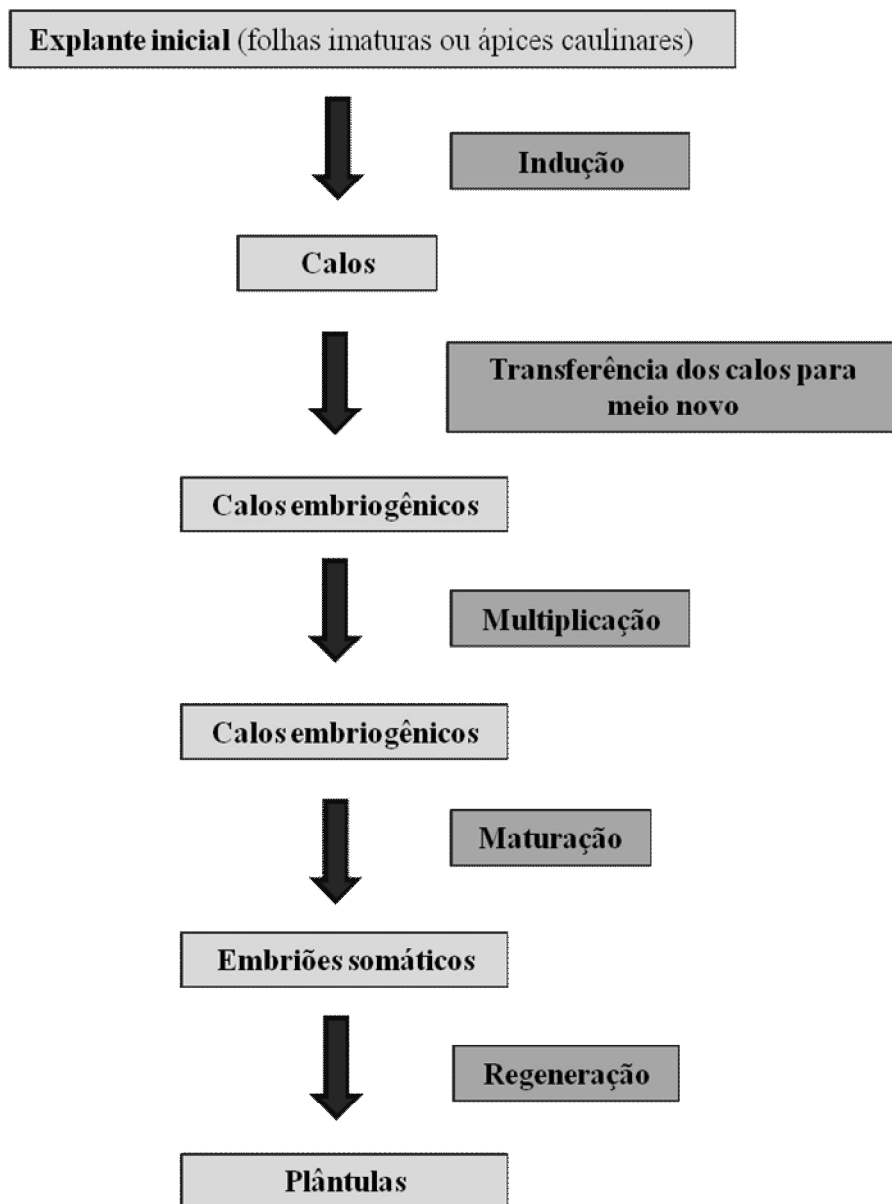


Figura 2. Esquema do processo de indução de embriogênese somática em cana-de-açúcar. Entre cada etapa foi transcorrido um período de 30 dias.

3.8 Estudos Anatômicos

3.8.1 Microscopia de Luz

3.8.1.1 Anatomia dos calos embriogênicos e embriões somáticos

Para a caracterização anatômica do processo de embriogênese somática a partir de tecidos foliares e ápices caulinares, foram coletados três explantes por tratamento, em intervalos de 0, 1, 2, 4, 8, 10, 15, 30, 45 e 60 dias de cultivo em meio para indução. Foram coletados também calos embriogênicos em meio de maturação e regeneração.

As amostras coletadas foram fixadas em FAA₅₀ (formaldeído, ácido acético e etanol 50%) durante 48 horas sob vácuo e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Elas foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica). Os blocos foram cortados transversal e longitudinalmente em secções de 5µm 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 realizadas em fotomicroscópio (Olympus AX70) equipado com sistema U-photo.

3.8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta etapa do trabalho foi realizada no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

A MEV foi empregada na observação e descrição dos caracteres morfológicos associados aos explantes iniciais, calos embriogênicos e não-embriogênicos e calos em processo de maturação e regeneração.

As amostras fixadas em etanol 70% foram desidratadas em série etílica e levadas à secagem em ponto crítico de CO₂. As amostras foram colocadas nos suportes com fita dupla-face e posteriormente metalizadas com ouro. As observações e documentações das imagens

foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (modelo Zeiss, LEO 1430 VP, Cambridge, Inglaterra).

3.9 Estudo da embriogênese somática e regeneração in vitro das cultivares RB855536 e RB92579

Foi também estudado o processo de embriogênese somática nas cultivares de cana-de-açúcar RB855536 e RB92579. Para tanto, foi utilizado o tipo de explante que melhor respondeu ao processo embriogênico. Foram também utilizados os melhores tratamentos observados na cultivar RB867515, para todas as etapas estudadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução da embriogênese somática

A formação de calos teve início após 3 dias de cultivo para os dois tipos de explantes. Neste período, eles já se apresentavam intumescidos e com o início da formação de calos particularmente nas extremidades dos explantes onde foram seccionados. Todas as concentrações de auxinas testadas promoveram a formação de calos, exceto o tratamento controle. A porcentagem de formação de calos nos dois tipos de explantes utilizados diminuiu linearmente com o aumento da concentração para todas as auxinas.

Nas folhas imaturas (Figura 3), a interação entre as diferentes auxinas e as concentrações utilizadas foi não significativa ($P > 0,05$). A análise das concentrações das auxinas por meio de polinômios ortogonais (Pimentel-Gomes, 1985), apresentou efeito linear significativo ($P < 0,05$), indicando que há uma redução na porcentagem de formação de calos à medida que aumenta a concentração das auxinas.

As auxinas 2,4-D e Picloram foram as mais eficientes na formação de calos, diferindo-se estatisticamente do dicamba, que apresentou as menores médias ($P < 0,05$). A concentração de 2 mg.L^{-1} , proporcionou maior porcentagem de formação de calos para as três auxinas

utilizadas. A porcentagem média de formação de calos variou um máximo de 86% e 85% (2,4-D e picloram, respectivamente, em 2 mg.L⁻¹) a 69% em 8 mg.L⁻¹ de dicamba.

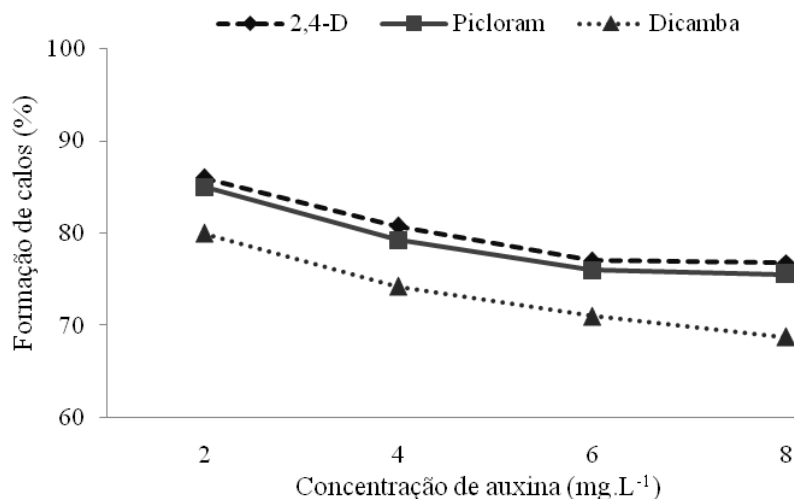


Figura 3. Porcentagem de formação de calos a partir de folhas imaturas de cana-de-açúcar, cultivar RB867515, após 30 dias em meio de indução.

Nos experimentos utilizando ápices caulinares (Figura 4), a interação entre as auxinas e as concentrações testadas foi não significativa ($P > 0,05$). A análise das concentrações das auxinas por meio de polinômios ortogonais apresentou efeito linear significativo ($P < 0,05$). Analisando a figura 4, pode-se observar que a formação de calos é inversamente proporcional ao aumento da concentração das auxinas, ou seja, a concentração de 2 mg.L⁻¹ foi a mais eficiente na formação de calos para todas as auxinas testadas.

Para este tipo de explante, houve uma alta porcentagem de formação de calos, variando de 98% no tratamento 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D a 85% em 8 mg.L⁻¹ de dicamba. A auxina 2,4-D diferiu estatisticamente apenas do dicamba ($P < 0,05$), apresentando as maiores médias de formação de calos (96,25%). Comparando-se a porcentagem de formação de calos entre ápices caulinares e folhas imaturas de cana-de-açúcar, os primeiros foram mais responsivos.

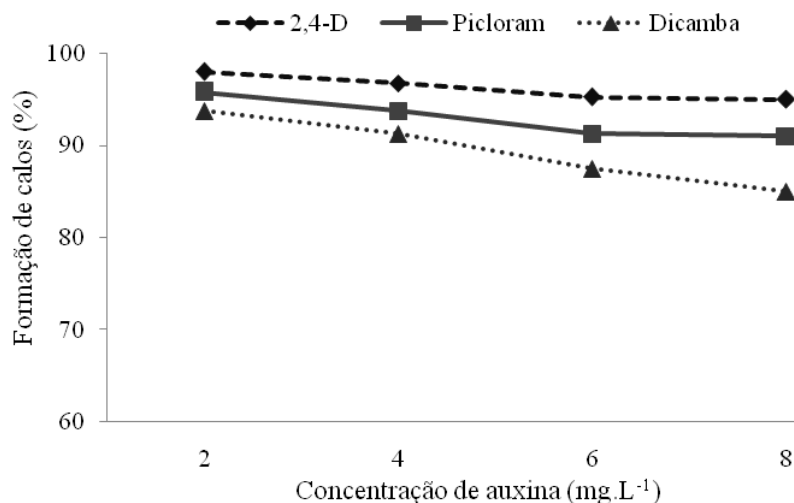


Figura 4. Porcentagem de formação de calos a partir de ápices caulinares de cana-de-açúcar, cultivar RB867515, após 30 dias em meio de indução.

A indução de calos é uma etapa determinante na embriogênese somática em cana-de-açúcar, influenciando diretamente a obtenção de embriões somáticos e a regeneração das plantas. Nesta fase preparatória ocorre a ativação do metabolismo, que culmina com a divisão celular (Handro e Floh, 1990). Vários são os fatores que afetam este processo, dentre eles destacam-se: tipo, estágio de desenvolvimento e fonte do explante inicial, composição do meio de cultura e o balanço hormonal estabelecido, além do genótipo da planta matriz (Guerra et al., 1999; Jiménez, 2001).

A indução da embriogênese somática tem sido relatada através da utilização de diversos tipos de explantes iniciais. Segundo Lakshmanan (2006), as folhas imaturas e inflorescências em desenvolvimento, são os explantes mais empregados na produção de calos embriogênicos em cana-de-açúcar. A utilização de ápices caulinares como fonte de explantes, como proposto neste trabalho, tem sido pouco relatada em cana-de-açúcar.

Aos 60 dias de cultivo foi avaliada a porcentagem de formação de calos embriogênicos, através da observação do material em lupa estereoscópica e analisados quanto a sua coloração e morfologia. Foi realizado também o teste do azul de Evans e carmim acético (Durzan, 1988) para confirmação da presença de células com potencial embriogênico na massa de calos (Figura 5).

Foram obtidos dois tipos morfológicos de calos com distintos potenciais morfogênicos: I) calos não-embriogênicos, que se caracterizavam pelo aspecto macio, mucilaginoso e translucido (Figura 5A) e, II) calos embriogênicos, com aspecto nodular, compacto/semi-compacto, coloração esbranquiçada a amarelada e facilmente destacáveis da estrutura original (Figura 5B). No mesmo explante também foi possível encontrar regiões com aspecto embriogênico e outras com características não-embriogênicas (Figura 5C).

Visando a confirmação do potencial embriogênico dos calos foi realizada a dupla coloração dos mesmos, com os corantes carmim acético e azul de Evans, inferindo quanto às possíveis culturas embriogênicas e não-embriogênicas (Figura 5D). As regiões que reagiram ao carmim acético, apresentando-se de coloração avermelhada confirmaram a característica embriogênica do material em estudo. A coloração azulada destacava a presença de células não-embriogênicas.

As células embriogênicas normalmente apresentam-se como agregados, com células isodiamétricas com citoplasma denso e reagem positivamente ao corante carmim acético. Durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário esse tipo de coloração permite a visualização tanto de células embriogênicas como de células não-embriogênicas (Durzan, 1988; Steiner et al., 2005).

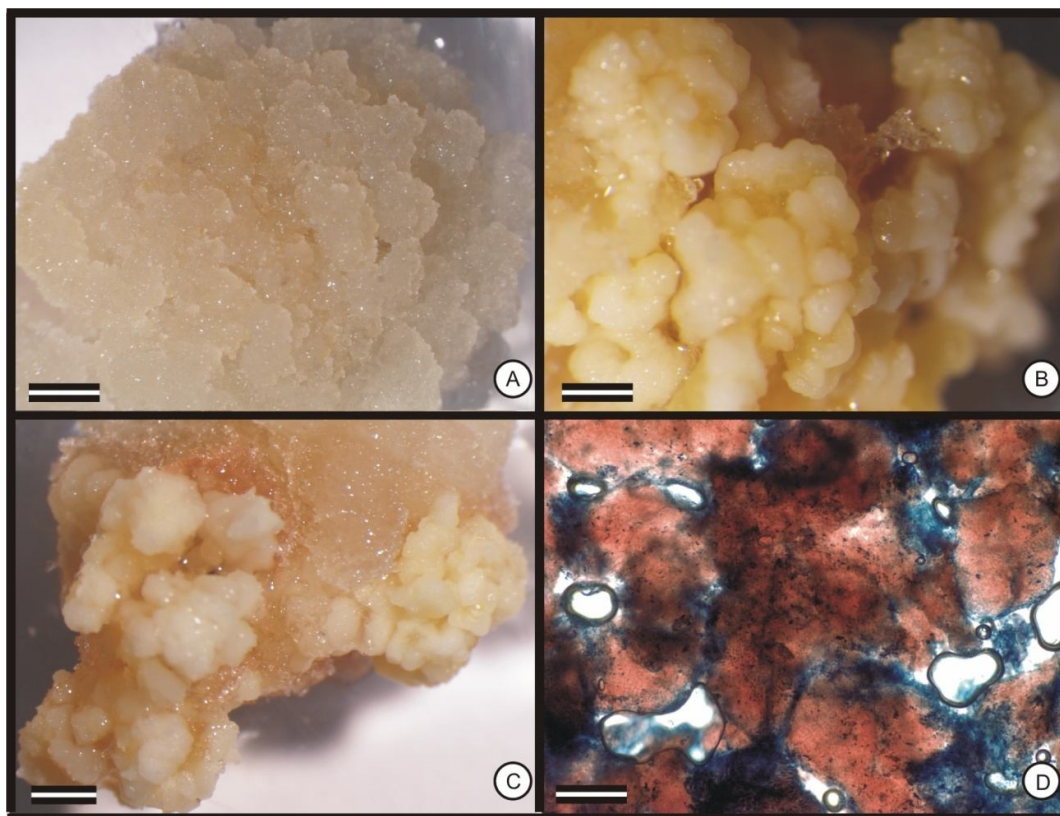


Figura 5. Calos de cana-de-açúcar após 60 dias em meio de indução. **A** - Calo não-embriogênico, com aspecto mucilaginoso e translúcido. **B** - Calo embriogênico, apresentando aspecto nodular, compacto e coloração esbranquiçada a amarelada. **C** - Calo apresentando regiões embriogênicas e não-embriogênicas. **D** - Teste do azul de Evans e carmim acético em calos embriogênicos de cana-de-açúcar. Barras: A=C = 2 mm. B = 1 mm. D = 400 μ M.

Um dos trabalhos pioneiros em embriogênese somática em cana-de-açúcar foi realizado por Ho & Vasil (1983a). Esses autores, a partir da utilização de segmentos de folhas imaturas estabeleceram a existência de três tipos de calos com potenciais morfogênicos distintos: (I) calo compacto, firme, e embriogênico; (II) friável, macio, semi-translúcido, mas não-embriogênico; e (III) mucilaginoso, macio, brilhante, e não-embriogênico. Eles também concluíram que a eficiência da produção de calos é dependente da idade da planta, do seu desenvolvimento e posição do explante na folha. Segundo Basnayake et al. (2011), a textura e morfologia dos calos são excelentes indicadores da sua habilidade de regeneração.

Avaliando-se a porcentagem de formação de calos embriogênicos com a utilização de folhas imaturas (Figura 6), a interação entre auxinas x concentração foi não significativa ($P > 0,05$). Através da análise por polinômios ortogonais para as diferentes concentrações, foi observado o efeito linear significativo ($P < 0,05$). A formação de calos embriogênicos diminuiu linearmente com o aumento da concentração das auxinas, sendo a concentração de 2 mg.L^{-1} a mais eficiente na formação de calos embriogênicos para as três auxinas avaliadas.

As diferentes auxinas utilizadas diferiram-se estatisticamente entre si quanto ao seu potencial de formação de calos embriogênicos ($P < 0,05$). O 2,4-D foi mais eficaz no processo de formação de calos embriogênicos (49,75%), seguido de picloram (43,19%) e dicamba (36%).

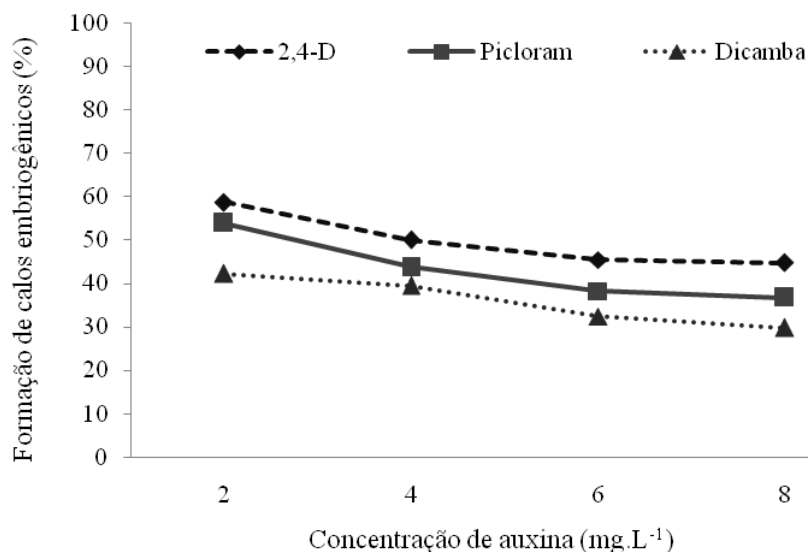


Figura 6. Porcentagem de formação de calos embriogênicos a partir de folhas imaturas de cana-de-açúcar, cultivar RB867515, após 60 dias em meio de indução.

Para a formação de calos embriogênicos a partir de ápices caulinares (Figura 7), a interação entre as auxinas e as concentrações utilizadas foi significativa ($P < 0,05$). A partir do desdobramento da interação de doses dentro de cada nível das auxinas, observou-se que os efeitos lineares e quadráticos foram significativos ($P < 0,05$).

A concentração mais potente na produção de calos embriogênicos foi 2 mg.L^{-1} , para todas as auxinas testadas ($P < 0,05$).

O 2,4-D foi a auxina mais eficaz na produção de calos embriogênicos (51,50%), seguido de picloram e dicamba (47,31% e 41,81%, respectivamente). A concentração de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D proporcionou uma maior formação de calos embriogênicos, apresentando um máximo de 72% e diminuindo para 41% em 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Picloram na concentração de 2mg.L⁻¹ também permitiu uma maior produção de calos embriogênicos (58%), se comparada as outras concentrações testadas.

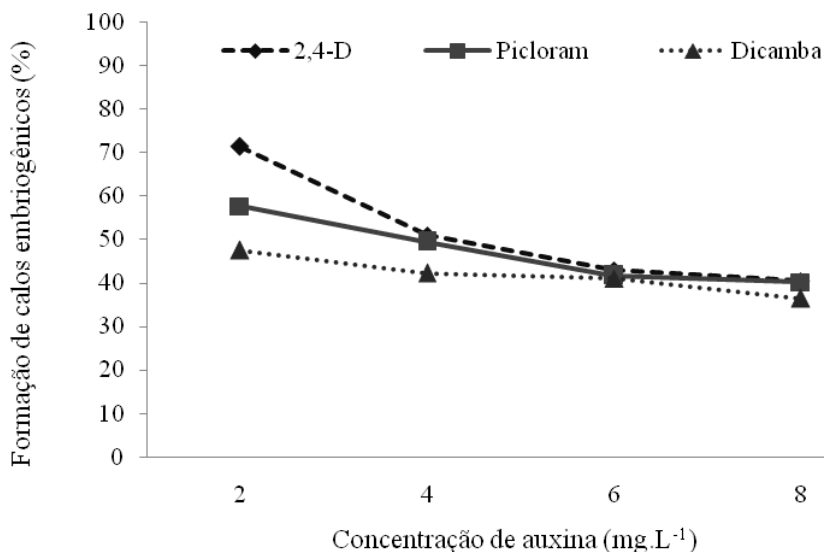


Figura 7. Porcentagem de formação de calos embriogênicos a partir de ápices caulinares de cana-de-açúcar, cultivar RB867515, após 60 dias em meio de indução.

Para a iniciação do processo de embriogênese somática é necessária a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultivo e, neste contexto, as auxinas destacam-se como a classe de hormônio vegetal mais importante na regulação da embriogênese somática (Cooke et al., 1993). As auxinas atuam de duas maneiras durante o crescimento celular: estimulando a acidificação da parede celular que resulta em uma elevada extensibilidade e induzindo a transcrição de mRNAs que codificam proteínas associadas ao crescimento celular (Richard et al., 2002).

O 2,4-D é comumente utilizado na indução de embriogênese somática em várias espécies da família *Poaceae*, assim como em cana-de-açúcar (Lakshmanan et al., 2006; Garcia et al., 2007). No presente trabalho, os explantes mantidos em meio com 2 mg.L⁻¹ de

2,4-D apresentaram uma maior porcentagem de formação de calos embriogênicos em relação aos demais tratamentos. Estes calos apresentavam-se com aspecto nodular, compacto e de coloração amarelada. Segundo Ho e Vasil (1983a), a formação de calos embriogênicos é inversamente proporcional à concentração de 2,4-D no meio de cultura.

Em cana-de-açúcar, o 2,4-D tem-se mostrado como um eficiente regulador de crescimento para a indução de calos e formação de embriões somáticos (Gallo-Meagher et al., 2000; Chengalrayan e Gallo-Meagher, 2001; Oropeza et al., 2001; Suprasanna et al., 2005; Khan e Khatri, 2006; Snyman et al., 2006; Nieves et al., 2008; Watt et al., 2009).

Ramos (2011), trabalhando com folhas imaturas provenientes de brotações laterais de cana-de-açúcar, obteve uma maior porcentagem de calos embriogênicos quando utilizou o 2,4-D (36,95%), enquanto nos tratamentos utilizando o dicamba foram obtidos apenas 29,26%.

A produção de calos embriogênicos é uma etapa fundamental para a transformação genética, seja por métodos diretos ou indiretos. O estabelecimento de culturas de calos embriogênicos constitui uma alternativa para o suprimento de tecidos-alvo, para a obtenção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar, via *A. tumefaciens* (Manickavasagam et al., 2004; Kalunke et al., 2009) ou pelo bombardeamento de partículas (Bower e Birch, 1992; Falco et al., 2000; Molinari et al., 2007).

Ao se comparar a resposta de folhas imaturas e ápices caulinares na obtenção de calos embriogênicos em cana-de-açúcar, os ápices caulinares permitiram maior proporção de explantes com calos embriogênicos.

A diferença na resposta entre estes explantes pode ser justificada devido aos ápices caulinares apresentarem maior proporção de células pluripotentes e com maior capacidade de divisão e multiplicação. Além disso, as folhas imaturas apresentam oxidação principalmente nas extremidades onde foram seccionadas. Esse processo ocorre a partir da liberação de compostos fenólicos por células danificadas pelo corte, levando a formação de quinonas que se difundem no meio de cultura, escurecendo-o. As quinonas além de serem tóxicas, podem afetar o desenvolvimento dos tecidos (Grattapaglia e Machado, 1998), podendo ser estas algumas das possíveis causas da menor resposta das folhas imaturas à produção de calos embriogênicos.

A utilização de ápices caulinares como fonte de explantes, proporciona uma alta porcentagem de formação de calos embriogênicos (72%), a obtenção de inúmeros explantes a partir de material estabelecido em laboratório, baixo índice de contaminação se comparado ao

material coletado diretamente do campo, além de permitir a condução de experimentos durante todo o ano.

Segundo Cidade et al., (2006), o uso deste tipo de explante apresenta vantagens em relação ao material de campo, como a constante disponibilidade de material e a uniformidade fisiológica, em virtude do cultivo sob condições controladas. Além disso, a oxidação dos explantes é reduzida e não há necessidade de desinfestação do material vegetal, realizada com a utilização de procedimentos agressivos aos tecidos e potencialmente prejudiciais à regeneração *in vitro*.

4.2 Multiplicação de calos embriogênicos

A multiplicação de calos embriogênicos é uma etapa de grande importância, pois permite a produção de material clonal em larga escala. Os calos classificados como embriogênicos foram transferidos para o meio de multiplicação, e após 30 dias nesse meio foi avaliado o potencial de multiplicação de acordo com os diferentes tratamentos utilizados. Nessa fase foram mantidas a auxina e a concentração que apresentaram maior eficiência na formação de calos embriogênicos (2 mg.L^{-1} de 2,4-D).

Em relação ao tipo de explante utilizado, os calos embriogênicos provenientes de ápices caulinares diferiram-se estatisticamente dos calos formados a partir de folhas imaturas ($P < 0,05$), apresentando uma maior capacidade de crescimento, quando mantidos em meio de multiplicação composto de 2 mg.L^{-1} de 2,4-D + 4 mg.L^{-1} de AIA. Esse meio foi responsável por um crescimento máximo de 3,64 g para os calos formados a partir de ápices caulinares, enquanto nas folhas imaturas este crescimento foi de 2,93 g. Para os demais tipos de meios, não houveram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tipos de explantes utilizados (Figura 8).

Analisando isoladamente cada tipo de explante inicial, para as folhas imaturas, os diferentes tipos de meio de multiplicação apresentaram diferenças estatísticas entre si ($P < 0,05$). Os meios acrescidos de 2 mg.L^{-1} de 2,4-D + 4 mg.L^{-1} de AIA e 2 mg.L^{-1} de 2,4-D + 100 mg.L^{-1} de L-asparagina foram os mais eficientes (2,93 g e 3,05 g, respectivamente), seguidos de 1,82 g para o meio com 2 mg.L^{-1} de 2,4-D + 4 mg.L^{-1} de AIA + 100 mg.L^{-1} de L-asparagina, e 1,38 g em 2 mg.L^{-1} de 2,4-D.

Para os ápices caulinares, o meio mais eficiente foi aquele composto por 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 4 mg.L⁻¹ de AIA (P < 0,05), que permitiu um crescimento dos calos embriogênicos de 3,64 g após 30 dias de cultivo, seguido pelo meio composto de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 100 mg.L⁻¹ L-asparagina (3,12 g).

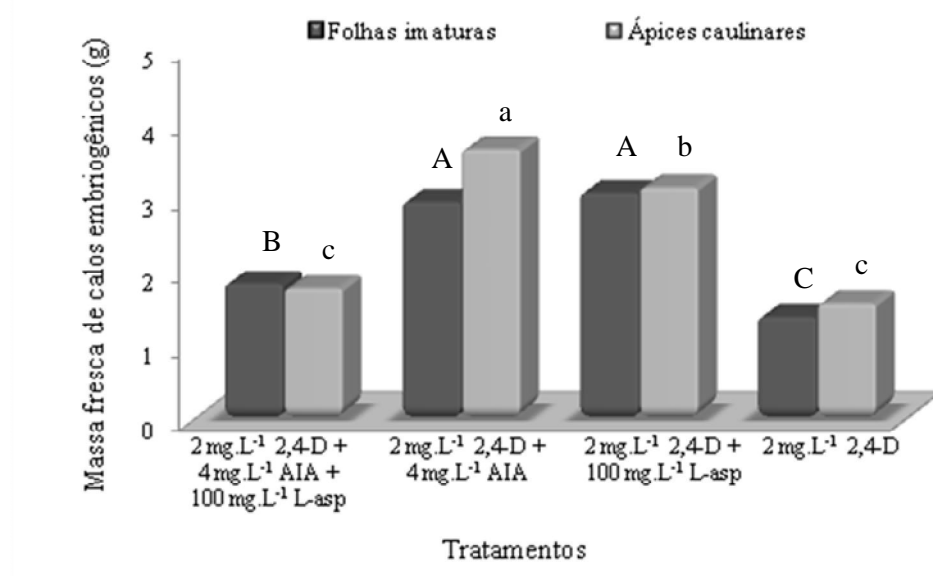


Figura 8. Massa fresca de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, cultivar RB867515, provenientes de folhas imaturas e ápices caulinares, de acordo com diferentes meios de multiplicação. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas são o teste para o crescimento de calos a partir de folhas imaturas e letras minúsculas para ápices caulinares.

Durante a etapa de multiplicação de calos embriogênicos, é necessário proporcionar condições adequadas para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e o controle dos processos de diferenciação, de tal maneira que as culturas sejam constituídas por células pró-embrionárias ou embriões somáticos em estágios globulares iniciais de desenvolvimento (Guerra et al., 1999).

Na fase de multiplicação, o 2,4-D no meio de cultura mantém estável a taxa de multiplicação celular no material em cultivo (Macedo, 2010). A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura, principalmente as auxinas, induz a multiplicação celular (Silveira et al., 2004). Segundo Dudits et al. (1995), o 2,4-D atua diretamente através de um aumento nos níveis endógenos de AIA e alterando o metabolismo das auxinas, podendo

contribuir para a multiplicação dos calos embriogênicos. Neste sentido, a associação do 2,4-D + AIA promoveu uma maior taxa de multiplicação de calos embriogênicos, como observado neste trabalho.

A adição de aminoácidos ao meio de multiplicação, como proposto no presente trabalho (2 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 100 mg.L⁻¹ de L-asparagina), não diferiu estatisticamente do meio acrescido de 4 mg.L⁻¹ de AIA (P > 0,05), para os calos embriogênicos produzidos a partir de folhas imaturas, sendo estes dois tratamentos os mais eficientes neste processo. Os aminoácidos têm sido utilizados como fonte de nitrogênio orgânico no cultivo *in vitro* de várias espécies como milho, sorgo, arroz e também em cana-de-açúcar visando melhorar o processo de indução de embriogênese somática e regeneração nestas espécies (Grewel et al., 2006; Asad et al., 2009).

4.3 Maturação e regeneração dos embriões somáticos

Os embriões somáticos obtidos no meio de multiplicação foram transferidos para o meio de maturação e permaneceram neste meio por 30 dias. Os meios de maturação consistiam de meio MS basal acrescido de diferentes concentrações de sacarose (30 e 60 g.L⁻¹) e fitagel (2,5 e 5,0 g.L⁻¹), sem a presença de auxinas. A porcentagem de regeneração de embriões somáticos em plantas foi avaliada de acordo com o meio de maturação utilizado.

Os tipos de explantes iniciais utilizados, não apresentaram diferenças estatísticas entre si, quanto a sua capacidade de regeneração em plantas (P > 0,05). As folhas imaturas proporcionaram em média 65% de regeneração e os ápices caulinares 63%.

Nos embriões somáticos produzidos a partir de folhas imaturas a interação entre os diferentes meios de maturação e regeneração foi não significativa (P > 0,05). Os meios de maturação (Figura 9) apresentaram diferenças estatísticas entre si (P < 0,05). Os tratamentos compostos de 30 g.L⁻¹ de sacarose + 2,5 g.L⁻¹ de fitagel e 60 g.L⁻¹ de sacarose + 5,0 g.L⁻¹ de fitagel foram os mais eficazes no processo de maturação (72% e 74% de regeneração, respectivamente).

Quanto aos meios de regeneração utilizados (Tabela 2), o meio MS acrescido dos reguladores de crescimento, BAP e GA₃ na concentração de 1 mg.L⁻¹ cada, promoveu uma maior regeneração de plantas (P < 0,05), se comparado ao meio MS basal.

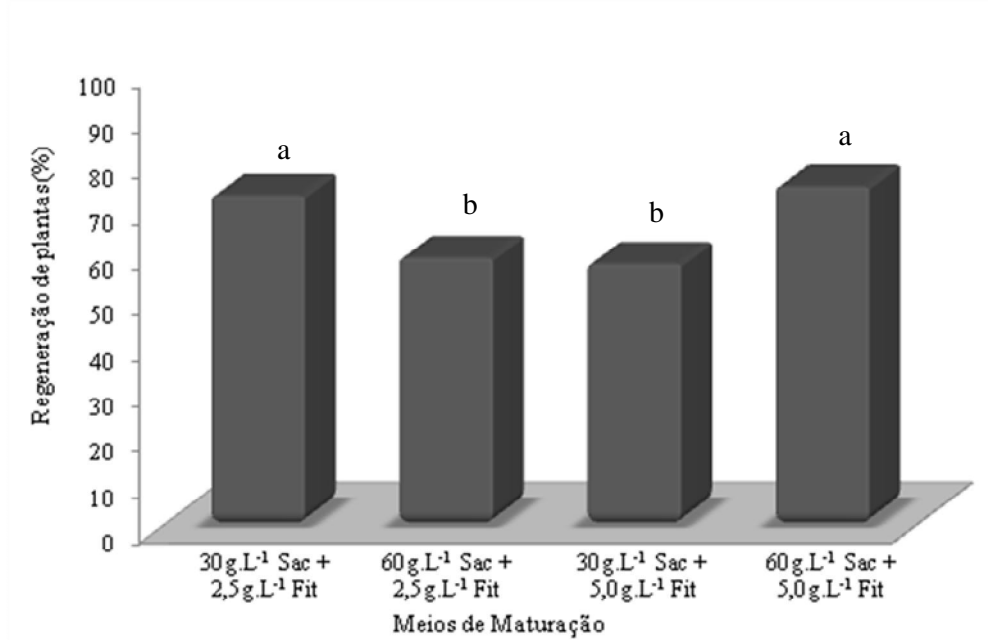


Figura 9. Percentual regenerativo de embriões somáticos produzidos a partir de folhas imaturas de cana-de-açúcar, cultivar RB867515, de acordo com diferentes meios de maturação. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Percentual regenerativo de embriões somáticos produzidos a partir de folhas imaturas de cana-de-açúcar, cultivar RB867515, de acordo com diferentes meios de regeneração (RC = reguladores de crescimento BAP e GA₃ na concentração de 1 mg.L⁻¹ cada).

Meio de regeneração	% de regeneração
Meio MS	62,75 b
Meio MS + RC	68,58 a

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Para os embriões somáticos produzidos a partir de ápices caulinares a interação entre os meios de maturação e regeneração foi não significativa ($P > 0,05$). Os meios de maturação (Figura 10) diferiram-se estatisticamente entre si ($P < 0,05$), sendo que, os embriões somáticos apresentaram uma maior porcentagem de regeneração quando cultivados em meio de maturação composto de 60 g.L⁻¹ de sacarose + 5,0 g.L⁻¹ de fitagel, apresentando um

máximo de 81,17% de regeneração de embriões em plantas. Os diferentes tipos de meio de regeneração utilizados não exerceram influência sobre a porcentagem de embriões somáticos regenerados, não apresentando diferenças estatísticas entre si ($P > 0,05$).

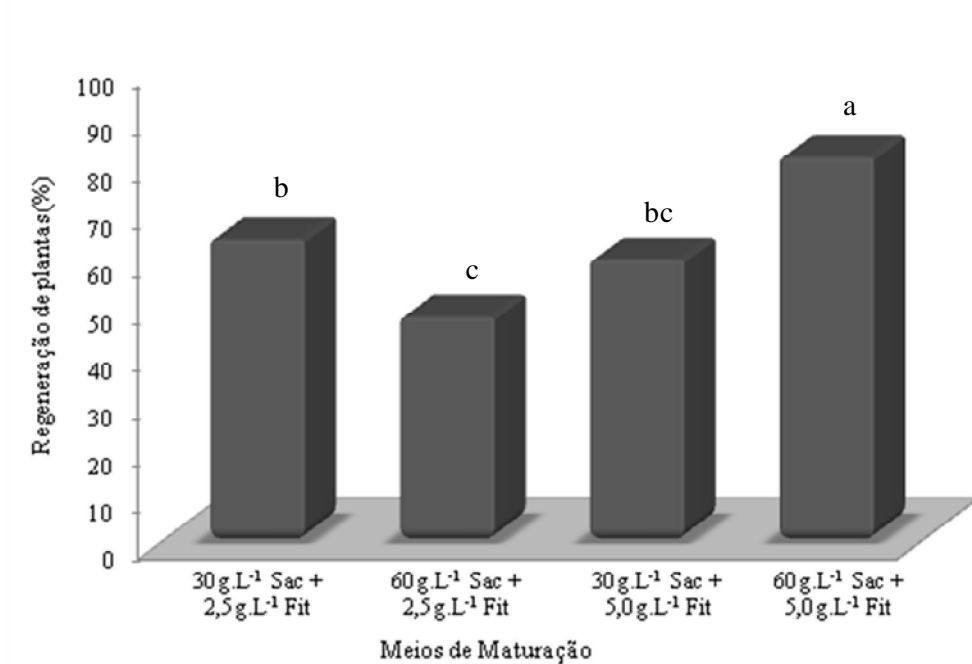


Figura 10. Percentual regenerativo de embriões somáticos produzidos a partir de ápices caulinares de cana-de-açúcar, cultivar RB867515, de acordo com diferentes meios de maturação. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando as auxinas são removidas e ocorre uma suplementação do meio de cultivo com promotores de maturação, obtêm-se embriões somáticos maduros passíveis de regeneração (Steiner et al., 2008). O embrião somático maduro é um sistema bipolar onde, em uma extremidade serão diferenciadas as células do sistema radicular, que futuramente desenvolverão as raízes e, na extremidade oposta, as células a partir das quais serão geradas folhas e ramos (Termignoni, 2005).

A alta concentração de sacarose presente no meio de maturação promoveu uma maior conversão das culturas embriogênicas em embriões somáticos maduros aptos à regeneração em plantas. Segundo Rafiq et al. (2005), o aumento da concentração de sacarose para 60 g.L⁻¹ em culturas embriogênicas de milho, também promoveu um aumento na maturação dos embriões somáticos. As variações na concentração da sacarose afetam as condições osmóticas do meio e o metabolismo do material em cultivo, influenciando nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (Pereira et al., 2003).

O aumento da concentração do agente solidificante fitagel no meio de cultura, aliado a alta concentração de sacarose possibilitou uma maior porcentagem de regeneração de embriões somáticos em plantas. Corroborando os resultados do presente trabalho, Kaur e Gosal (2009) avaliaram o efeito da dessecação, causada pelo dobro da concentração do agente solidificante no meio de cultura, demonstrando que esse é um método alternativo para melhorar a eficiência da embriogênese somática em cana-de-açúcar. Pois, promove o desenvolvimento e a diferenciação do embrião somático aumentando sua frequência de regeneração.

O ABA, presente em todos os tratamentos de maturação, promove a individualização dos embriões somáticos, o seu desenvolvimento e maturação. Além disso, ele inibe a germinação precoce dos embriões, induz a síntese de proteínas de reserva, envolvidas no aumento da tolerância à desidratação (Dunstan et al. 1998).

O processo regenerativo de embriões somáticos em plantas geralmente ocorre em meio desprovido de reguladores de crescimento e na presença da luz, porém, a eficiência deste processo pode ser aumentada pela adição de diferentes reguladores ao meio de cultivo. No presente estudo, a adição de BAP e GA₃, promoveu uma maior porcentagem de regeneração apenas para os embriões somáticos produzidos a partir de folhas imaturas.

4.4 Indução da embriogênese somática nas cultivares RB855536 e RB92579

A capacidade de formação de calos em cana-de-açúcar tem sido descrita como sendo uma resposta genótipo dependente (Cidade et al., 2006; Lakshmanan, 2006), apresentando grande influência na resposta morfogênica, tornando-se necessária a avaliação de diferentes cultivares.

A utilização de ápices caulinares como fonte de explantes no processo de indução de embriogênese somática possibilitou uma maior porcentagem de formação de calos embriogênicos, se comparado a utilização de folhas imaturas. Neste sentido, foi avaliada a porcentagem de formação de calos a partir de ápices caulinares nas cultivares de cana-de-açúcar RB855536 e RB92579 inoculadas em meio MS basal acrescido de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, que como foi observado anteriormente apresentou a melhor resposta embriogênica.

A calogênese nas duas cultivares utilizadas (Figura 11) apresentou diferenças significativas entre si ($P < 0,05$). A cultivar RB855536 apresentou uma maior capacidade de formação de calos, 93%, enquanto para a RB92579 este valor foi de 77%. Na cultivar RB867515, como apresentado anteriormente, a porcentagem de formação de calos foi de 98%, não apresentando diferença significativa com a RB855536. Esses resultados encontrados apresentaram grande variação dessas cultivares com a RB92579, indicando que o crescimento dos calos é dependente do genótipo.

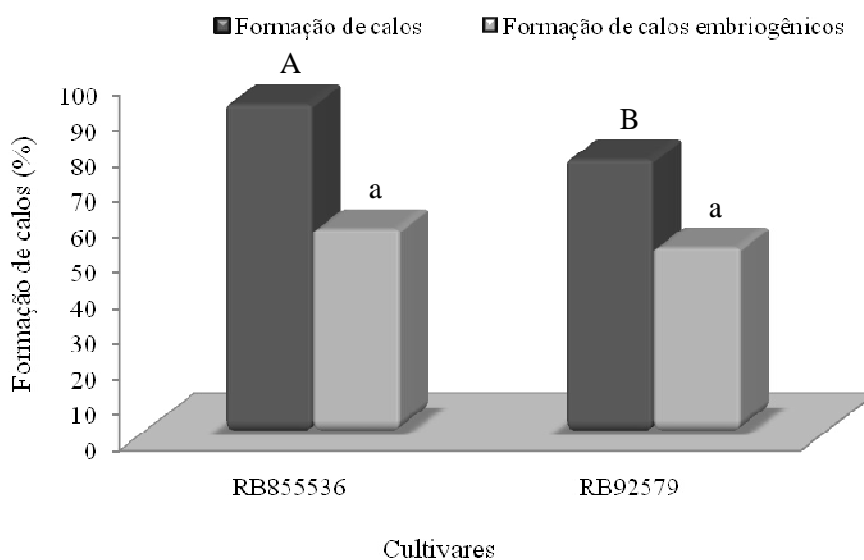


Figura 11. Formação de calos a partir de ápices caulinares de cana-de-açúcar nas cultivares RB855536 e RB92579, em meio suplementado com 2mg.L^{-1} de 2,4-D. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas teste para formação de calos. Letras minúsculas teste para formação de calos embriogênicos.

Quanto à habilidade das cultivares estudadas em produzirem calos embriogênicos (Figura 11), as mesmas não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($P > 0,05$). A produção de calos embriogênicos para estas cultivares foi de 57% para a RB855536 e 52% para a RB92579. Quando comparadas conjuntamente as três cultivares, estas apresentam diferenças estatísticas entre si ($P < 0,05$), ou seja, a RB867515 foi mais eficiente na capacidade de formação de calos embriogênicos (72%), enquanto as demais cultivares não apresentaram diferenças entre si.

Dentre as várias auxinas, o 2,4-D é a mais utilizada no processo de indução de embriogênese somática (Fehér et al., 2003). Em cana-de-açúcar as concentrações desse regulador, mais utilizadas neste processo são: 2 mg.L⁻¹ (Wamaita et al., 2010) e 3 mg.L⁻¹ (Shomeili et al., 2011). No presente trabalho, a concentração de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D proporcionou a formação calos embriogênicos de coloração amarelada, aspecto nodular e compacto.

Na fase de multiplicação, os calos embriogênicos foram transferidos para o meio MS acrescido de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 4 mg.L⁻¹ de AIA, que foi considerado o tratamento mais eficaz na multiplicação de calos embriogênicos obtidos a partir de ápices caulinares na cultivar RB867515.

As duas cultivares estudadas não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$), quanto a sua capacidade de crescimento em meio de multiplicação por 30 dias (Figura 12). As cultivares RB855536 e RB92579 apresentaram um crescimento médio de 3,19 g e 2,64 g, respectivamente.

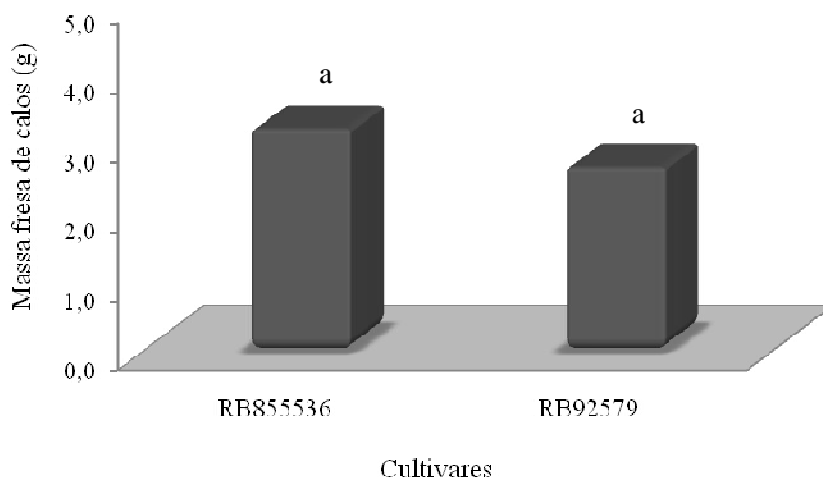


Figura 12. Massa fresca de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, cultivares RB855536 e RB92579, após 30 dias em meio de multiplicação composto de MS + 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 4 mg.L⁻¹ de AIA. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Os embriões somáticos provenientes da fase de multiplicação foram transferidos para o meio de maturação constituído de meio MS acrescido de 60 g.L⁻¹ de sacarose + 5,0 g.L⁻¹ de fitagel que, para a cultivar RB867515 apresentou a melhor resposta regenerativa.

A determinação da resposta embriogênica e a identificação de cultivares com capacidade de regeneração elevada são essenciais para a utilização dos mesmos em programas de seleção *in vitro* e no processo de transformação genética.

No presente estudo, a interação entre as diferentes cultivares e os meios de regeneração foi não significativa ($P > 0,05$). As cultivares RB855536 e RB92579 não apresentaram diferenças estatísticas entre si quanto a sua capacidade de regeneração de embriões somáticos em plantas ($P > 0,05$), apresentando em média 55% de regeneração (Figura 13). Se comparadas à regeneração da cultivar RB867515, estas cultivares possuem potencial regenerativo relativamente baixo, pois nesta cultivar, os embriões somáticos produzidos a partir de ápices caulinares obtiveram um percentual máximo de regeneração de 81,17%, enquanto para as folhas imaturas 74,33%.

A presença ou ausência de reguladores de crescimento no meio de regeneração (BAP e GA₃), não influenciou a capacidade regenerativa dos embriões somáticos em plantas para as duas variedades utilizadas ($P > 0,05$).

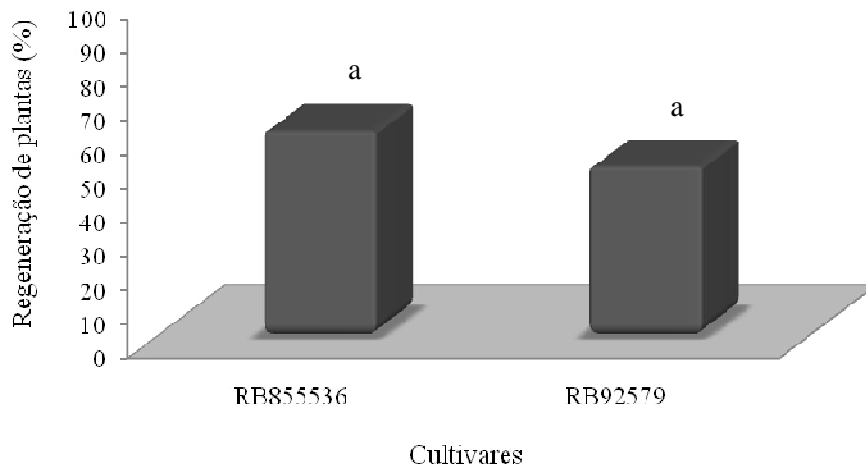


Figura 13. Percentual regenerativo de embriões somáticos em plantas de cana-de-açúcar, cultivares RB855536 e RB92579. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Além do tipo de explante utilizado, como pode ser observado no presente trabalho, um outro importante fator que afeta a resposta embriogênica e regenerativa da cana-de-açúcar é o genótipo utilizado. A utilização de um determinado genótipo depende da sua capacidade de

formação de calos embriogênicos e a sua regeneração em plantas. Uma ampla gama de diferentes genótipos de cana-de-açúcar foi empregada na produção de calos embriogênicos: RB738735 e RB72455 (Lima et al., 2001), RB758540, RB739735, RB701143 e Chonne (Garcia et al., 2007), RB855156 (Molinari et al., 2007), RB835486 (De Jesus, 2010), RB872552 (Silva, 2010); SP803280 (Macedo, 2010), RB867515, RB928064 e RB925345 (Ramos, 2011), mas nem todas as cultivares apresentam resposta embriogênica e capacidade de regeneração semelhantes, indicando que estas características são genótipo-dependentes.

Gandonou et al. (2005), avaliaram a resposta embriogênica e regenerativa de nove genótipos de cana-de-açúcar para a inserção dos mesmos em programas de melhoramento *in vitro*. A avaliação de calos embriogênicos (compactos, cor branca a creme e estrutura nodular) e não-embriogênicos (aspecto translúcido e cor acastanhada) foi realizada com base nos aspectos morfológicos destes materiais. Os genótipos testados apresentaram alto percentual de produção de calos embriogênicos (60 a 100%), além de alta taxa de regeneração, variando entre 88 e 100%, confirmando que a capacidade de regeneração de plantas é genótipo-dependente e altamente correlacionada com a produção de calos embriogênicos. Ramos (2011), não observou diferenças significativas entre as diferentes cultivares utilizadas, quanto a capacidade regenerativa dos embriões somáticos em plantas.

Entre as cultivares avaliadas neste trabalho, a RB867515, além de possibilitar uma elevada formação de calos embriogênicos, também apresentou maior regeneração dos embriões somáticos em plantas.

Os resultados observados no presente estudo demonstram a viabilidade no processo de embriogênese somática nas cultivares de cana-de-açúcar RB867515, RB855536 e RB92579, com a conversão de embriões em plantas num período de 150 dias após a inoculação dos explantes *in vitro*.

4.5 Microscopia de luz

Os explantes foliares foram inoculados em sentido longitudinal no meio de indução (Figura 14A). No estudo anatômico dos segmentos foliares (Figura 14B) observa-se a presença de vários primórdios foliares em diferentes estádios de desenvolvimento. Nos primórdios mais internos ainda não havia diferenciação entre xilema e floema. A partir dos

primórdios foliares mais externos, o sistema vascular já se apresentava bem diferenciado na nervura central. Ao 3º dia de indução (Figura 14C), foi observado o entumescimento dos explantes foliares e reentrâncias na face abaxial das folhas, que está associado a proliferação/divisão celular de células da epiderme ou parênquima voltadas para essa face. No 10º dia em meio de indução (Figura 14D), foi observado na nervura principal das folhas intensa proliferação de células da epiderme e sub-epiderme. A divisão celular e o entumescimento foi mais pronunciada nas folhas mais externas do explante, que se mostravam com diferenciação avançada dos feixes vasculares.

A proliferação de calos iniciou-se nas extremidades dos explantes, como pode ser observado nos explantes foliares após 15 dias em meio de indução (Figura 14E). Os centros de divisão celular ocorreram principalmente em torno dos feixes vasculares, onde observou-se a formação de regiões meristemáticas adjacentes aos feixes aos 15 dias de indução (Figura 14F). As regiões meristemáticas caracterizam-se por apresentarem células isodiamétricas, em intensa divisão celular, nucléolo denso, alta relação núcleo/citoplasma, parede celular fina e são intensamente coradas com azul de toluidina.

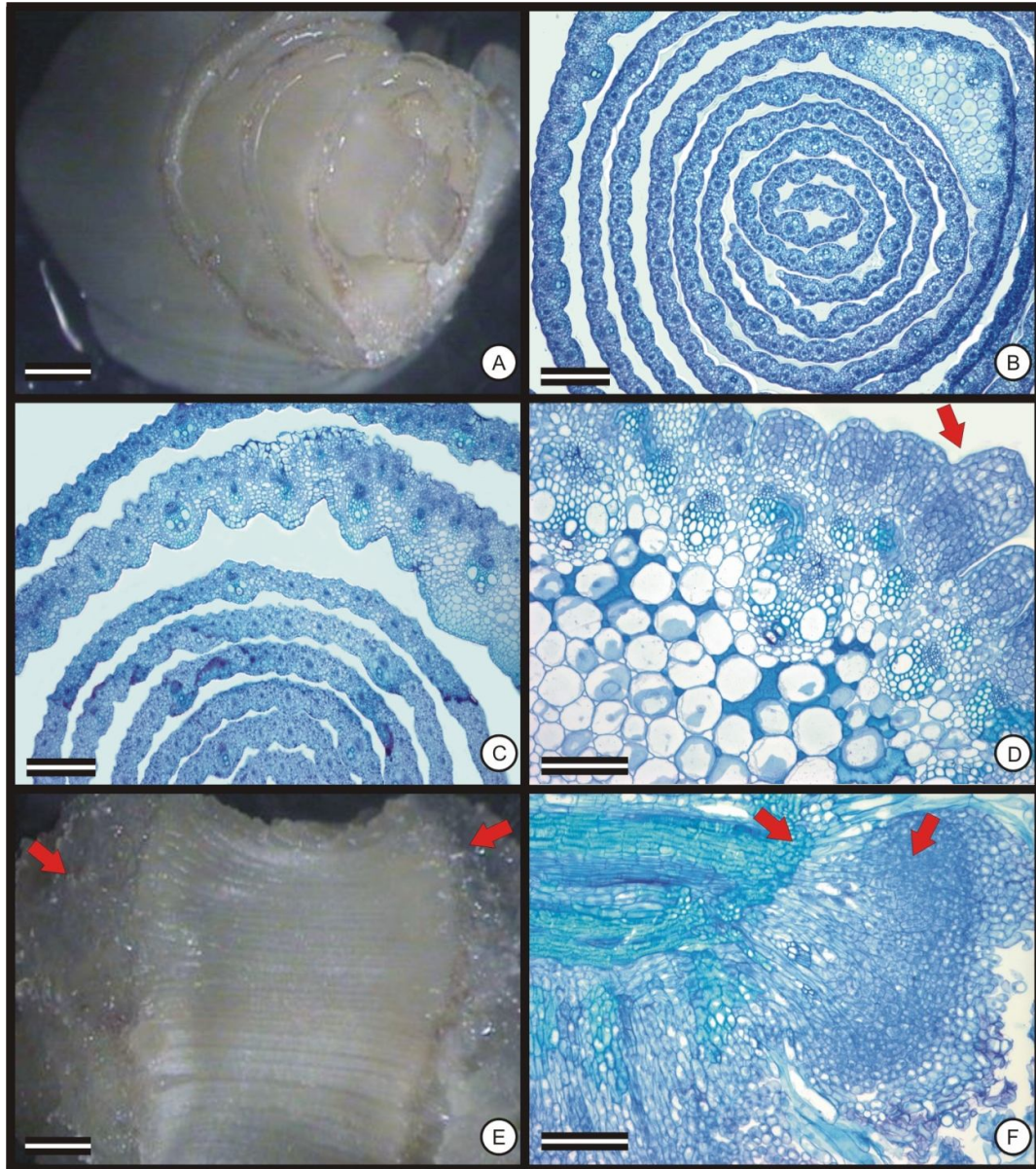


Figura 14. Indução de calos a partir de folhas imaturas de cana-de-açúcar RB867515. **A** - Explante foliar inicial em meio de indução. **B** - Secção transversal dos explantes foliares iniciais. **C** - Secção transversal dos explantes foliares aos 3 dias de indução. **D** - Detalhe da face abaxial dos explantes foliares aos 10 dias de indução (as setas vermelhas destacam a proliferação de células da epiderme ou sub-epiderme do explante). **E** - Explante foliar aos 15 dias em meio de indução (as setas vermelhas indicam a formação de calos nas extremidades do explante). **F** - Secção longitudinal dos explantes foliares aos 15 dias em meio de indução (as setas indicam a formação de regiões meristemáticas a partir dos feixes vasculares). Barras = A =E = 1 mm. B=C = 400 μ M. D=F = 200 μ M.

A caracterização anatômica da embriogênese somática em cana-de-açúcar é uma importante ferramenta no entendimento e confirmação deste processo (Nadar et al., 1978; Ho e Vasil, 1983 a, b; Falco et al., 1996; Garcia et al., 2007; Ramos, 2011).

Ho e Vasil (1983a), através da utilização de folhas imaturas de cana-de-açúcar estudaram anatomicamente o processo de embriogênese somática. Eles observaram que, os segmentos foliares mais externos do explante, que apresentavam diferenciação dos feixes vasculares, mostravam intensa divisão celular, resultando em intumescimento dos tecidos. Eles demonstraram ainda que, os centros de divisão celular se situam principalmente em torno dos feixes vasculares. Sendo que estas divisões deram origem a calos nodulares na superfície do explante. A extensa atividade de divisão celular na periferia dos calos resultou em várias camadas de células embriogênicas pequenas, densamente citoplasmáticas, com presença de grãos de amido e núcleos conspícuos.

Aos 60 dias, em meio de indução, foi possível observar calos embriogênicos com aspecto nodular, firme, compacto e de coloração amarelada a esbranquiçada (Figura 15A). A secção histológica deste material (Figura 15B) revelou a formação de regiões meristemáticas (regiões mais coradas) nas extremidades dos calos embriogênicos, evidenciando a formação de estruturas nodulares. Essas áreas se distinguiram das demais regiões dos calos embriogênicos por apresentarem células em intensa divisão celular.

Os calos embriogênicos, quando transferidos para o meio de maturação, passam por um processo de diferenciação em embriões somáticos através do seu desenvolvimento e maturação. Em meio de maturação as células embriogênicas iniciam o seu processo de individualização em embriões somáticos e separação dos calos adjacentes (Figura 15C). No início da individualização desses embriões foi possível observar estruturas isoladas com a presença de um ápice caulinar (Figura 15D), caracterizado pela presença de células meristemáticas em intensa divisão celular.

O embrião somático maduro particulariza-se por sua orientação bipolar típica (presença de ápices caulinar e radicular) e ausência de conexão vascular destas estruturas com o calo. No presente estudo, a partir da utilização de folhas imaturas, foi possível observar a regeneração de uma estrutura isolada (Figura 15E), apresentando sistema vascular fechado, protoderme bem definida, a presença do ápice radicular com início de formação da coleoriza (Figura 15F) e parte da porção caulinar, caracterizando-a como um embrião somático.

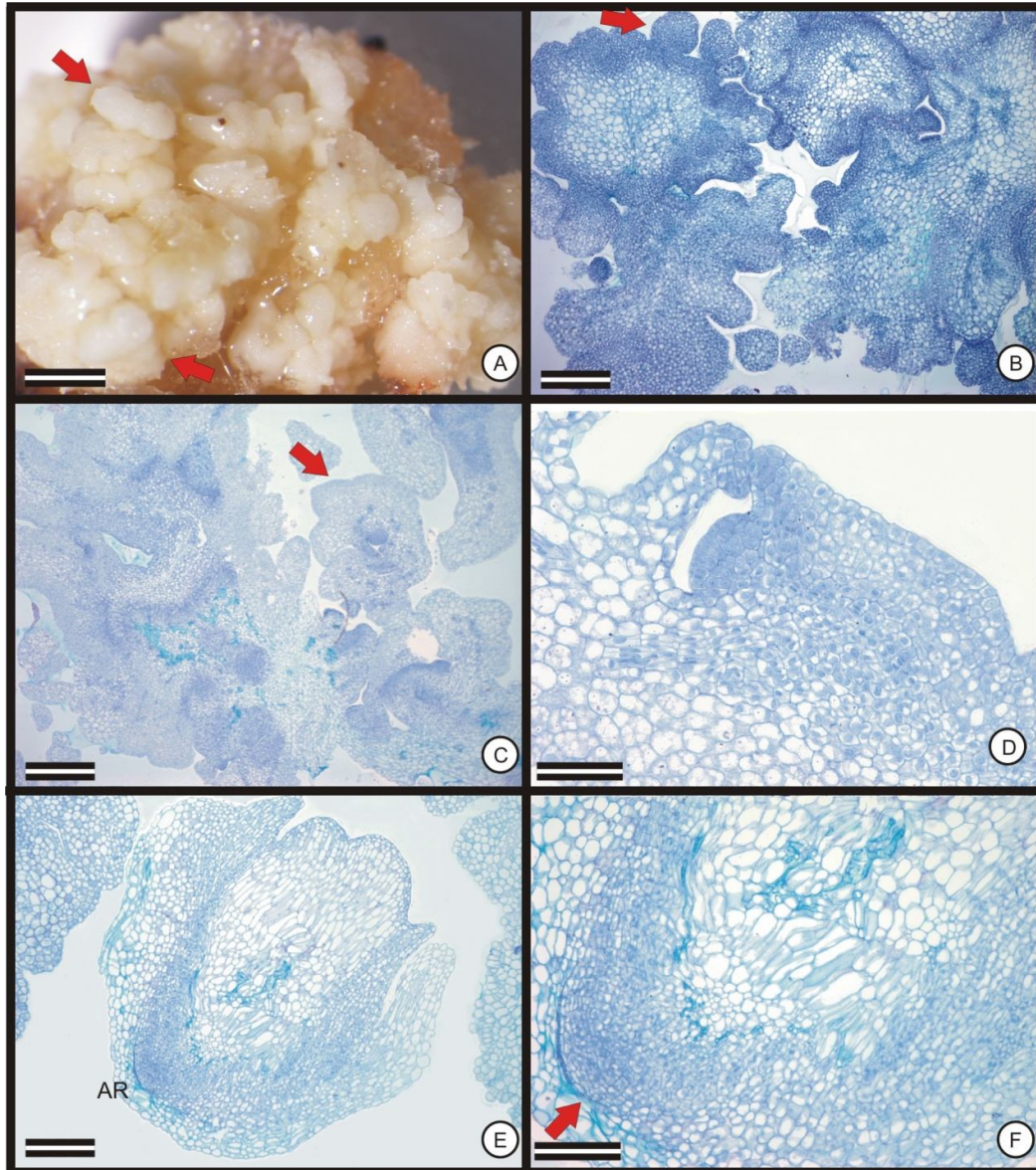


Figura 15. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas de cana-de-açúcar RB867515. **A** - Calo embriogênico após 60 dias de cultivo em meio com 2 mg.L^{-1} de 2,4-D (as setas vermelhas indicam estruturas nodulares, características de calos embriogênicos). **B** - Secção histológica dos calos embriogênicos após 60 dias em meio de indução (a seta indica as estruturas nodulares presentes nas extremidades dos calos embriogênicos). **C** - Secção histológica de um calo embriogênico em meio de maturação (a seta indica uma estrutura isolada contendo o ápice caulinar do embrião somático). **D** - Destaque de um ápice caulinar apresentando células meristemáticas, assemelhando-se ao coleótilo. **E** - Secção longitudinal de um embrião somático de cana-de-açúcar, apresentando ápice radicular e sistema vascular fechado (AR = ápice radicular). **F** - Destaque do ápice radicular do embrião somático com início da formação da coleorriza. Barras: A = 2 mm. B =C=E = 400 μM . D = 100 μM . F = 200 μM

No embrião somático maduro é possível observar a existência de orientação bipolar típica, com presença de ápices caulinar e radicular, conectados por cordões procambiais. E também a ausência de conexão vascular desses com os calos adjacentes, permitindo assim, a distinção do processo de embriogênese da organogênese (Ho e Vasil, 1983a; Falco et al., 1996). Essas observações foram confirmadas por Ramos (2011), que utilizando folhas imaturas provenientes de brotações laterais, empregadas no processo de embriogênico de cana-de-açúcar, observou a presença de embriões somáticos contendo o ápice caulinar e radicular, sistema vascular fechado e protoderme característica.

Os ápices caulinares de cana-de-açúcar utilizados como explantes no processo de embriogênese somática eram formados por um meristema apical, uma parte basal e de três a cinco primórdios foliares adjacentes, apresentando aproximadamente de 1 a 2 mm de diâmetro (Figura 16A). A secção histológica dos ápices caulinares (Figura 16B), evidenciou células com características meristemáticas na porção apical, como alta relação núcleo/citoplasma, citoplasma denso, pequenos vacúolos e núcleo volumoso com um ou dois nucléolos aparentes. As células da região basal eram mais volumosas e altamente vacuolizadas, com citoplasma pouco denso e baixa relação núcleo/citoplasma. Aos 3 dias após a indução (Figura 16C), os ápices caulinares apresentavam-se intumescidos e com início de formação de calos nas extremidades do explante, fato que pode ser observado também através da secção histológica deste material (Figura 16D).

Aos 15 dias em meio de indução, o explante já apresentava a formação de calos em praticamente toda a sua superfície abaxial (Figura 16E). Na secção histológica deste material podem ser observadas nas extremidades destes explantes regiões fortemente coradas, evidenciando a presença de células meristemáticas em intensa divisão celular (Figura 16F).

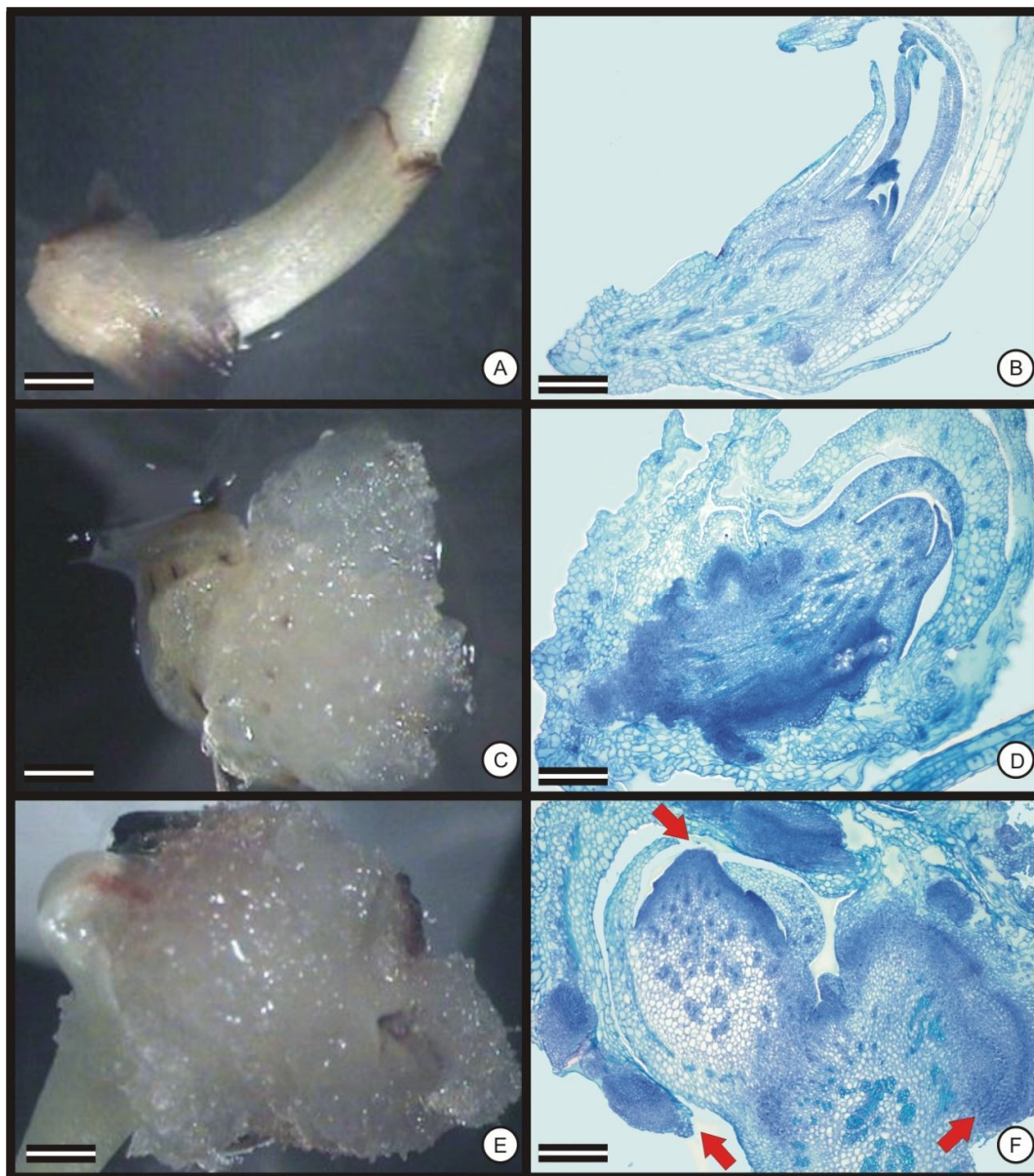


Figura 16. Indução de calos a partir de ápices caulinares de cana-de-açúcar RB867515. **A** - Explante inicial em meio de indução. **B** - Secção longitudinal do explante inicial. **C** - Ápice caulinar após 3 dias em meio de indução. **D** - Secção longitudinal do ápice caulinar após 3 dias em meio de indução. **E** - Ápice caulinar após 15 dias em meio de indução. **F** - Secção histológica do ápice caulinar após 15 dias em meio de indução (as setas vermelhas indicam regiões com aspecto meristemático na parte apical e extremidades do explante). Barras = A=C=E = 1 mm. B=D=F = 400 μ M.

Os calos embriogênicos, caracterizados anatomicamente aos 60 dias em meio de indução apresentavam-se de coloração amarelada a esbranquiçada e possuíam aspecto compacto com a presença de nódulos embriogênicos (Figura 17A). A secção histológica deste material (Figura 17B) apresentou características embriogênicas típicas como, protoderme bem definida e regiões meristemáticas nas extremidades dos calos dando origem aos nódulos embriogênicos.

Segundo Ho e Vasil (1983b), as células embriogênicas são pequenas, possuem intensa divisão celular, com núcleo proeminente e grãos de amido conspícuos. Estas células são geralmente presentes em pequenos e compactos agregados e mostraram competência para embriogênese. As células não-embriogênicas são grandes, vacuolizadas e muitas vezes alongadas, com citoplasma escasso e poucos grãos de amido, sendo que, estas células não apresentaram competência morfogênica.

Quando transferidos para o meio de maturação os calos embriogênicos se diferenciam em embriões somáticos maduros, caracterizando-se pela presença da bipolaridade. O ápice caulinar do embrião somático (Figura 17C) apresenta células meristemáticas a partir das quais serão geradas folhas e ramos. Nas análises histológicas se observa uma assincronia do processo, identificando-se embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento. Segundo Macedo (2010), durante a diferenciação do embrião somático ocorrem intensos eventos de divisão e crescimento em volume celular que resultam na formação de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento.

A figura 17D evidencia um embrião somático maduro apresentando protoderme característica e ausência de ligação aos calos adjacentes. Foi observada ainda, a presença de ápice radicular, escutelo, procâmbio e primórdios foliares.

De acordo com Ho e Vasil (1983a), o desenvolvimento dos embriões foi caracterizado pela formação de um entalhe lateral, indicando o início do escutelo. A região do ápice caulinar foi organizada primeiramente, e em seguida, o ápice radicular, organizado na parte basal do embrião. O escutelo consistia de células grandes com grãos de amido conspícuos. O embrião bem desenvolvido apresentou um coleóptilo envolvendo o ápice caulinar com várias folhas embrionárias e na outra extremidade, a coleoriza protegendo o ápice radicular.

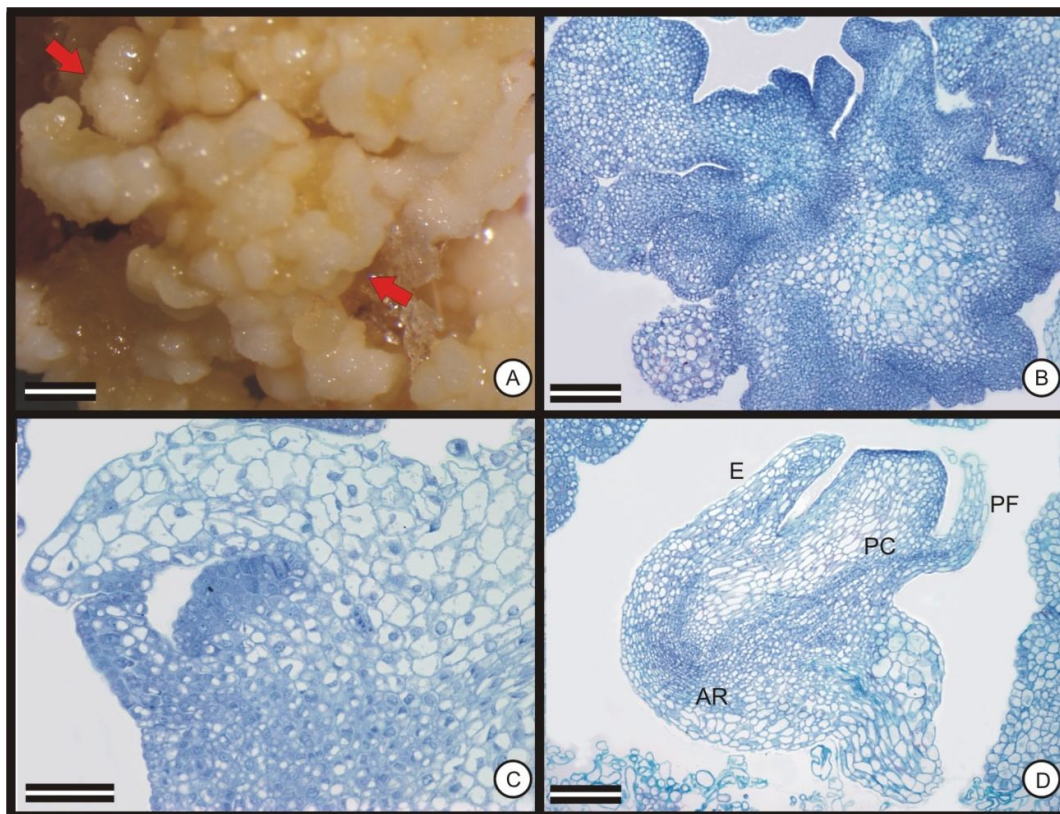


Figura 17. Embriogênese somática a partir de ápices caulinares de cana-de-açúcar RB867515. **A** - Calo embriogênico após 60 dias de cultivo em meio com 2 mg.L^{-1} de 2,4-D (as setas vermelhas indicam os nódulos embriogênicos). **B** - Secção histológica dos calos embriogênicos após 60 dias em meio de indução. **C** - Destaque do ápice caulinar de um embrião somático aos 30 dias em meio de maturação. **D** - Secção longitudinal de um embrião somático de cana-de-açúcar, apresentando ápice radicular e sistema vascular fechado (E = escutelo. AR = ápice radicular. PC = procâmbio. PF = primórdio foliar). Barras: A = 2mm. B=D = 400 μm . C= 100 μm .

Considerando as figuras 17B, 17C e 17D como uma sequência cronológica do evento de embriogênese somática, pode-se inferir que o embrião somático tem origem em uma massa de calos com características meristemáticas.

Falco et al. (1996), caracterizando anatomicamente a embriogênese somática a partir de folhas jovens de cana-de-açúcar, obtiveram a formação de dois tipos de calos: um nodular, compacto e com células com citoplasma denso (calos embriogênicos), e outro friável, translúcido, com células grandes e alongadas (calos não-embriogênicos). Sendo que, a regeneração em plantas só ocorreu nos calos embriogênicos. Eles observaram ainda que a embriogênese não é a única via de regeneração que ocorre nestes materiais. Concluindo que, a regeneração das plantas ocorreu tanto por organogênese como por embriogênese somática

simultaneamente. Através das análises anatômicas é possível comprovar se o processo de regeneração de plantas *in vitro* ocorre através da embriogênese somática ou organogênese.

Os embriões zigóticos das monocotiledôneas apresentam estruturas características como o escutelo, coleótilo e coleorriza. O embrião é separado do endosperma pelo escutelo, que através de diástases secretoras mobilizam o alimento armazenado no endosperma. A plúmula é cercada por um órgão cilíndrico, o coleótilo, que a protege. A radícula tem uma coifa normal e, como a plúmula, é fechada por um órgão de proteção, a coleorriza (Dillewijn, 1952).

No presente trabalho, não foi possível identificar a presença de um embrião somático apresentando tanto o meristema apical caulinar quanto o radicular. Porém, conforme a morfologia dos eventos de regeneração e semelhanças com características dos embriões somáticos considerou-se que os eventos de regeneração observados sejam efetivamente embriões somáticos.

Os embriões somáticos produzidos a partir de folhas imaturas e ápices caulinares, obtidos no meio de maturação, foram transferidos para o meio de regeneração, composto de meio MS basal ou MS acrescido de 1 mg.L^{-1} de GA_3 e BAP. Após 10 dias os embriões já iniciavam o processo de regeneração, apresentando pequenos pontos clorofilados e arroxeados, devido à presença da antocianina, na massa de embriões somáticos. Após 30 dias, em meio de regeneração, os embriões somáticos já haviam se convertido em plântulas de cana-de-açúcar (Figura 18A).

As plântulas regeneradas a partir dos embriões somáticos (Figura 18B), produzidas tanto a partir de folhas imaturas quanto ápices caulinares foram transferidas de placas de Petri para frascos contendo o mesmo meio, a fim de proporcionar um melhor desenvolvimento das mesmas (Figura 18C). Após 30 dias as plantas foram transferidas para tubetes e mantidas em câmara de nebulização por 15 dias (Figura 18D). Após este período as plântulas foram transplantadas para vasos e levadas para casa-de-vegetação (Figuras 18E e 18F).

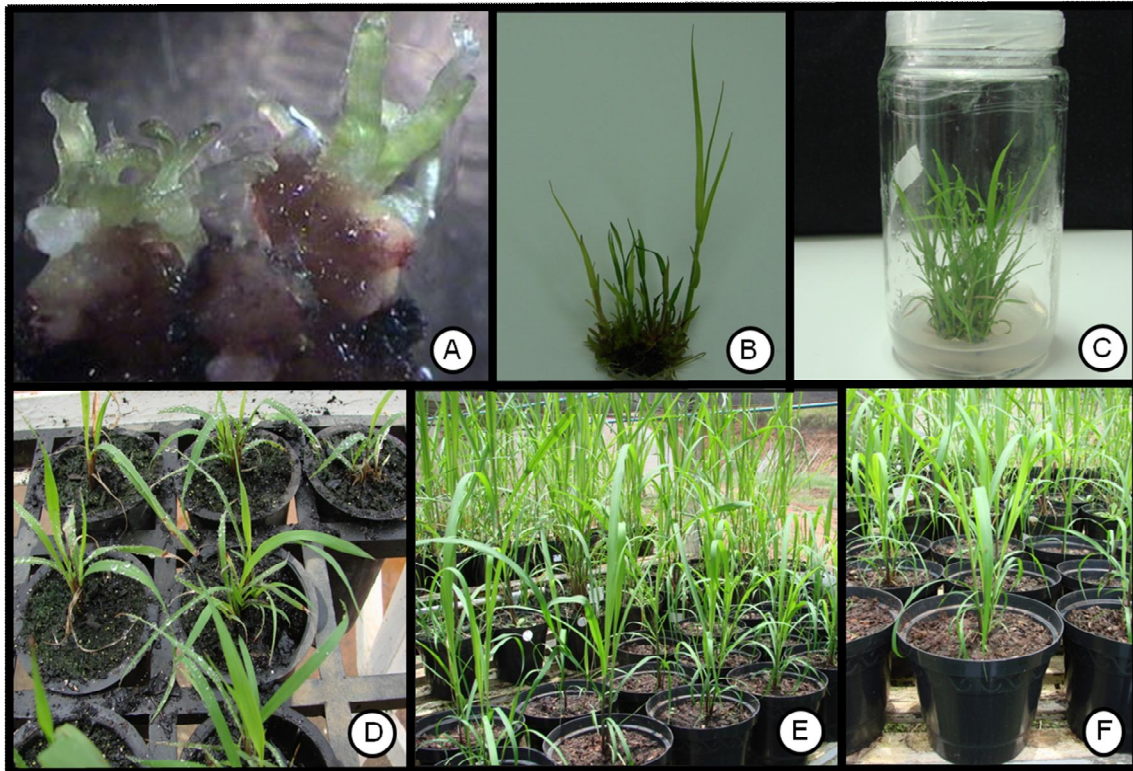


Figura 18. Regeneração e aclimatização de plantas de cana-de-açúcar RB867515. **A** - Plântula após 30 dias em meio de regeneração. **B** – Plântula de cana-de-açúcar regenerada a partir de embriões somáticos. **C** - Plântulas em frascos contendo meio de regeneração. **D** - Aclimatização de plântulas em tubetes em câmara de nebulização. **E-F** - Plantas de cana-de-açúcar em casa de vegetação.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura

Os calos iniciais, desenvolvidos nas extremidades dos explantes, tornaram-se visíveis a partir do 3º dia de cultivo tanto nas folhas imaturas (Figura 19A) quanto nos ápices caulinares (Figura 19B), em meio suplementado com 2 mg.L^{-1} de 2,4-D.

Dois tipos de calos, com características morfológicas distintas, foram observados no material em cultivo para os dois tipos de explantes estudados, após 60 dias em meio de indução: calos embriogênicos e não embriogênicos. Os calos embriogênicos (Figura 19C), possuíam uma conformação compacta e apresentavam uma organização nodular na sua superfície. Esses nódulos embriogênicos eram constituídos por uma superfície de aspecto

granular. Os calos não embriogênicos (Figura 19D) consistiam de um conjunto de estruturas alongadas, desorganizadas e altamente dissociadas.

A presença de setores não embriogênicos em calos embriogênicos (Figura 19E) também foi observada e, segundo Nadar et al, (1978), esta situação foi atribuída a presença de áreas com células senescentes ou mortas.

Os calos embriogênicos quando transferidos para o meio de maturação passam por um processo de diferenciação e individualização dos embriões somáticos. Através das análises, em MEV, pode-se observar os nódulos embriogênicos que se tornam compactos e individualizados em embriões somáticos no estágio globular (Figura 19F). Ho e Vasil (1983a) também encontraram estruturas globulares na superfície dos calos embriogênicos.

Após a diferenciação dos calos embriogênicos, em embriões somáticos, estes já se encontravam aptos para a regeneração em plantas. Aos 10 dias, em meio de regeneração (Figura 19G), foi possível observar nos embriões somáticos um escutelo folhoso, apresentando tricomas característicos e a presença de primórdios foliares. Aos 30 dias em meio de regeneração (Figura 19H), foi possível observar uma plântula de cana-de-açúcar regenerada e as folhas das plântulas formadas apresentavam inúmeros tricomas na sua superfície.

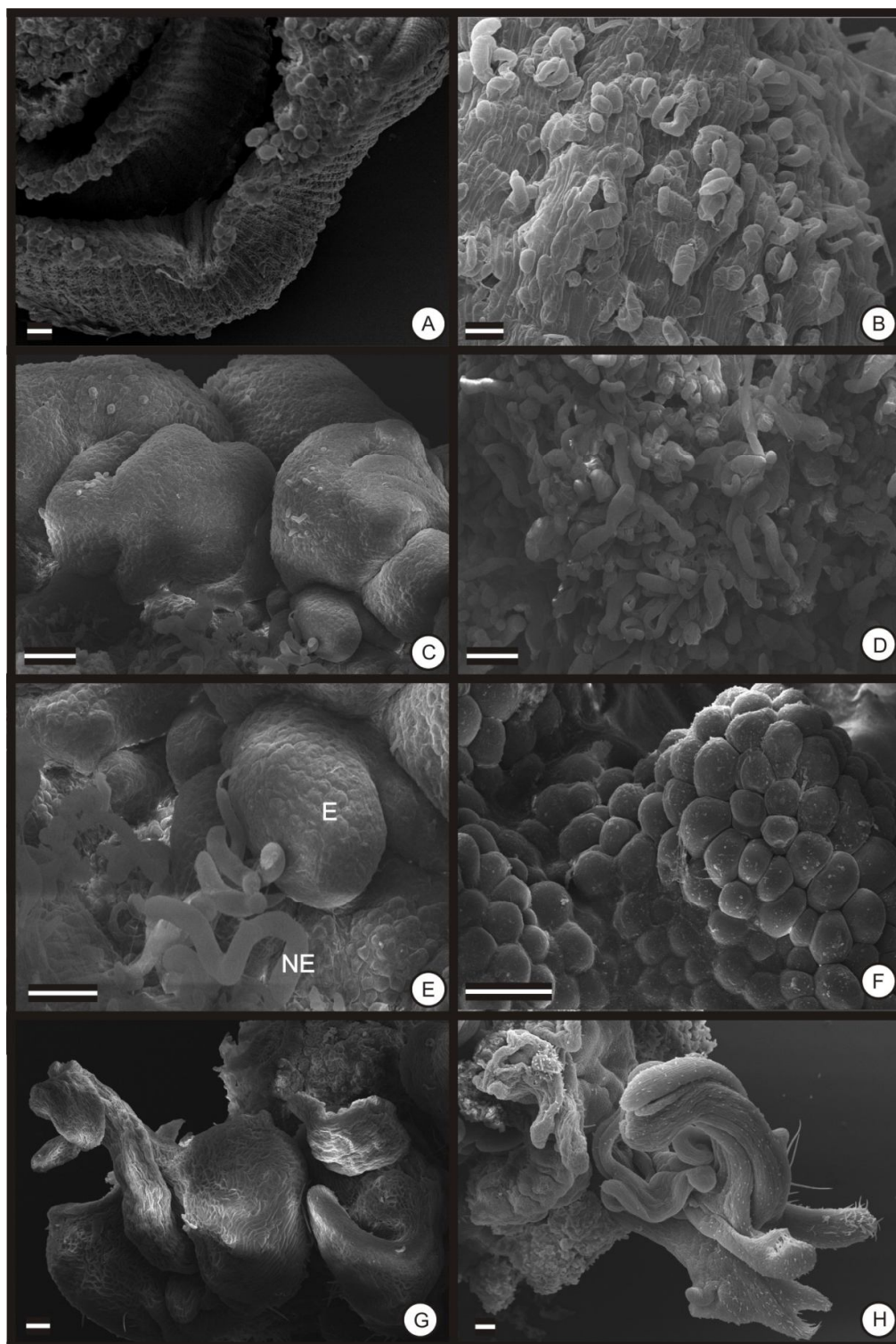


Figura 19. Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar. **A** - Folhas imaturas aos 3 dias em meio de indução. **B** - Epiderme dos ápices caulinares aos 3 dias em meio de indução. **C** - Superfície de calos embriogênicos aos 60 dias de cultivo em meio de indução. **D** - Calos não embriogênicos, apresentando proliferação desorganizada de células. **E** - Calo com presença de regiões embriogênicas

(E) e não embriogênicas (NE). **F** - Superfície de um calo embriogênico em meio de maturação, apresentando muitas estruturas globulares. **G** - Embriões somáticos aos 10 dias em meio de regeneração. **H** - Plântula de cana-de-açúcar aos 30 dias em meio de regeneração. Barras: A = 200 μ M. B=E=F = 100 μ M. C=D=G=H = 200 μ M.

Corroborando os resultados encontrados no presente trabalho, Rodríguez et al. (1995), também observaram diferenças morfológicas em calos de cana-de-açúcar, sendo que, os calos embriogênicos apresentavam um aspecto compacto, organizando-se em uma estrutura globular, enquanto os não embriogênicos possuíam uma configuração alongada e altamente desorganizada.

Bradley et al. (2001), caracterizando a embriogênese somática em duas espécies de gramíneas através da MEV concluíram que a embriogênese foi iniciada a partir da formação de calos compactos apresentando setores granulados na sua superfície. Durante o desenvolvimento dos embriões somáticos, tornou-se evidente o escutelo e, mais tarde o coleóptilo, na base do escutelo. O escutelo para as duas espécies avaliadas exibiu uma natureza folhosa indicada pela formação de tricomas na sua superfície. Os tricomas característicos do escutelo foram diferentes daqueles formados nas folhas (Ho e Vasil, 1983a).

5. CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho, os resultados obtidos permitiram concluir que:

- O 2,4-D na concentração de 2 mg.L^{-1} foi a auxina mais eficiente na indução de calos embriogênicos em cana-de-açúcar.
- A utilização de ápices caulinares como explantes iniciais permitiu uma maior produção de calos embriogênicos, se comparado ao uso de folhas imaturas.
- Embriões somáticos de cana-de-açúcar, com uma alta taxa de regeneração em plantas, foram obtidos com a adição de 60 g.L^{-1} de sacarose e $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de fitagel.
- Os estudos anatômicos na cultivar RB867515, permitiram a caracterização do processo de embriogênese somática e a confirmação desta via de regeneração.
- A cultivar RB867515 apresentou maior porcentagem de formação de calos embriogênicos e regeneração de embriões somáticos em plantas, que as cultivares RB855536 e RB92579.
- Foi possível a regeneração de plantas de cana-de-açúcar via embriogênese somática para as cultivares de RB867515, RB855536 e RB92579, num período de 150 dias após a inoculação dos explantes.

6. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLOOWALIA, B.S.; MARETZKI, A. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 21-25, 1983.

ALI, A.; NAZ, S.; IQBAL, J. Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane. (*Saccharum officinarum*). **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, p. 1961-1971, 2007.

ALI, A.; NAZ, S.; SIDDIQUI, F.A.; IQBAL, J. An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, p. 139-149, 2008.

ARENCIBIA , A.D.; CARMONA, E.R.; CORNIDE, M.T.; CASTIGLIONE; S.; O'RELLY, J.; CHINEA, A.; ORAMAS, P.; SALA, F. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell electroporation. **Transgenic Research**, v.8, p. 349-360, 1999.

ASAD, S.; ARSHAD, M.; MANSOOR, S.; ZAFAR, Y. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1214-1218, 2009.

BADAWY, O.M.; NASR, M.I.; ALHENDAWI, R.A. Response of sugarcane (*Saccharum* species hybrid) genotypes to embryogenic callus induction and *in vitro* salt stress. **Sugar Tech**, v. 10, p. 243-247, 2008.

BARBA, R.; NICKELL, L.G. Nutrition and organ differentiation in tissue culture of sugarcane – a monocotyledon. **Planta**, v. 89, p.299-302, 1969.

BASNAYAKE, S.W.V.; MOYLE, R.; BIRCH, R.G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. . **Plant Cell Reports**, v. 30, p.439-448, 2011.

BEHERA, K.K.; SAHOO, S. Rapid *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv Nayana) through callus culture. **Nature and Science**, v.7, p. 1-10, 2009.

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

BOZHKOVA, 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, p. 20, 2002.

BRADLEY, E. Y.; BAI, Y.; TALLURY, S. P.; QU, R. Scanning electron microscopic study on *in vitro* somatic embryogenesis of perennial ryegrass and tall fescue. **International Turfgrass Society**, v. 9, p. 146-151, 2001.

BRISIBE, E.A.; MIYAKE, H.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Abscisic acid and high osmoticum regulation of development and storage reserve accumulation in sugarcane [*Saccharum officinarum*] somatic embryos. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 63, p. 689-698, 1994.

CHANDRAN, K. In vitro multiplication and conservation of *Saccharum* germplasm. **Indian Journal of Plant Genetic Resources**, v. 23, p. 65-68, 2010.

CHANDRAN, K. In Vitro Regeneration of *Saccharum edule* from immature inflorescence. **Sugar Tech**, v. 19, p. 170-173, 2011.

CHENGALRAYAN, K.; ABOUZID, A.; GALLO-MEAGHER, M. *In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 477-482, 2005.

CHENGALRAYAN, K.; GALLO-MEAGHER, M. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. **In Vitro Cellular & Developmental 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.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra Brasileira. Cana-de-Açúcar**. Safra 2011/2012. Segundo Levantamento. Agosto/2011. 21p. 2011.

COOKE, T.J.; RACUSEN, R.H. COHEN, J.D. The role of auxin in plant embryogenesis. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1494-1495, 1993.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution in sugarcane. In: D.J. HEINZ (ed.), Sugarcane improvement through breeding. **Elsevier Press**, p. 7-84, 1987.

DE JESUS, F.A. **Transformação genética de cana-de-açúcar com os genes da aquaporina SspTIP1;1 e SspPIP1;4**. 2010. 55p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

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, p.764-768, 2004.

DILLEWIJIN, C.V. **Botany of sugarcane**. Chronica Botanica, 371p., 1952.

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, p. 957-963, 1975.

DUNSTAN, D.I.; DONG, J.Z.; CARRIER, D.J.; ABRAMS, S.R. Events following ABA treatment of spruce somatic embryos. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, v. 34, p.159–168, 1998.

DURZAN, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: Hakkgren, J.E. **Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology**. v. 8, p. 147-186. Swedish University of Agricultural Sciences, 1988.

FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.93-97, 1996.

FALCO, M.C.; NETO, A.T.; ULIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1188-1194, 2000.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.

FERREIRA, D.F. Sistema para análise de variância para dados balanceados (SISVAR). Lavras: UFLA; 1999. 92p.

FITCH, M.M.M.; MOORE, P. Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures 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 and Developmental Biology-Plant**, v. 36, p. 37-40, 2000.

GANDONOU, C.; ERRABII, T.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; CHIBI, F.; SENHAJI, N.S. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). **African Journal of Biotechnology**, v. 4, 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 sugarcane are determined by light and type of growth regulator. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 181–190, 2007.

GEETHA, S.; PADMANABHAN, D. Effect of hormones on direct somatic embryogenesis in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 3, p. 120-121, 2001.

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

GOEL, Y.; SINGH, V.P.; LAL, M.; SHARMA, M.L. *In vitro* morphogenesis in leaf sheath explants of sugarcane hybrid var. CoS 99259. **Sugar Tech**, v. 12, p. 172-175, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa – CBAB, v. 2, p. 533-568, 1998.

GREWAL, D.; GILL, R.; GOSAL, S.S. Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in indica rice. **Plant Biotechnology**, v.1, p. 1158-1162, 2006.

GUERRA, P. M.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, v. 2, p. 533-568, 1999.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**, ABCTP/EMPRAPA-CNPH, Brasília, p. 203-212, 1990.

HEERDT, E. **Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar**. 2008. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

HEINZ, D.J.; MEE, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science**, v. 9, p.346–348, 1969.

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

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

IRVINE, J.E.; BENDA, G.T.A.; LEGENDRE, B.L.; MACHADO, G.R.J. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture. II. Evidence for vegetative and genetic transmission, epigenetic effects and chimeral disruption. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p.115-125, 1991.

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

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 523p., 1940.

KALUNKE, R.M.; KOLGE, A.M.; BABU, K.H.; PRASAD, D.T. *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane for borer resistance using *Cry IAa3* gene and one-step regeneration of transgenic plants. **Sugar Tech**, v. 11, p. 355-359, 2009.

KAUR, A.; GOSAL. Desiccation of callus enhances somatic embryogenesis and subsequent shoot regeneration in sugarcane. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 332-334, 2009.

KHAN, I.A.; KHATRI, A. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: histological studies. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, p. 631-636, 2006.

KHAN, S.A.; RAHID, H.; CHAUDHARY, M.F.; CHAUDHRY, Z.; AFROZ A. Rapid micropropagation of three elite sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. **African Journal Biotechnology**, v. 7, p. 2147-2180, 2008.

LAKSHMANAN, P. Invited review addendum: somatic embryogenesis in sugarcane - an addendum to the invited review 'sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities'. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, p. 345-363, 2006.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES R.J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C.P.L.; BERDING, N.; SMITH, G.R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1007-1015, 2006.

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

LEMOS, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; NETO, C.E.R.; ALBUQUERQUE, M.M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1359-1364, 2002.

LIMA, M.A.C.; GARCIA, R.O.; MARTINS, G.S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 73-77, 2001.

LINACERO, R.; LÓPEZ-BILBAO, M.G.; VÁZQUEZ, A.M. Expression of different abscisic acid-responsive genes during somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protoplasma**, v. 217, p. 199-204, 2001.

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

MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V.R.; SUDHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; KASTHURIRENGAN, S. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 134-143, 2004.

MARCANO, A.K.; GUEVARA, P.M.; OROPEZA, M.; GARCÍA, E. Optimización del proceso de embriogênese somática em variedades vazoelanas de caña de azúcar. **Revista Acta Científica Vazoelana**, v. 53, p. 1-24, 2002.

MELO, C.G.; BARBOSA, M.H.P.; MOTOIKE, S.Y.; VIEIRA, M.S.; VENTRELLA, M.C.; PETERNELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.A.R. Preculture sugarcane tissue in sucrose-supplemented culture medium to induce desiccation tolerance. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.11, p. 320-329, 2011.

MING, R.; LIU, S.C.; MOORE, P.H.; IRVINE, J.E.; PATERSON, A.H. QTL analysis in a complex autopolyploid: genetic control of sugar content in sugarcane. **Genome Research**, v. 11, p. 2075-2084, 2001.

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

MOLINARI, H.B.C.; MARUR, C.J.; DAROS, E.; CAMPOS, M.K.F.; CARVALHO, J.F.R.P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.130, p.218-229, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays 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.

NICKELL, L. G. Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. **Hawaii Plant Rec**, v. 57, p. 223-229, 1964.

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.

NIEVES, N.; SEGURA-NIETO, M.; BLANCO, M.A.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J.L.; CASTILLO, R. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 39, p. 343-345, 2003.

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

OROPEZA, M.; MARCANO, A.K.; GARCIA, E.A. Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspension of sugarcane (*Saccharum* sp). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.37, p. 211-216, 2001.

PANDEY, R.N.; RASTOGI, J.; SHARMA, M.L.; SINGH, R.K. Technologies for cost reduction in sugarcane micropropagation. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 7814-7819, 2011.

PATHAK, S.; LAL, M.; TIWAN, A.K.; SHARMA, M.L. Effect of growth regulators on *in vitro* multiplication and rooting of shoot cultures in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 11, p. 86-88, 2009.

PEREIRA, R.A.; PASQUAL, M.; CHAGAS, E.A.; FRÁGUAS, C.B.; DUTRA, L.F. Indução de embriões somáticos globulares e cordiformes de cafeeiros por BAP e sacarose. **Scientia Agraria**, v.4, p.77-80, 2003.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. São Paulo: Nobel, 1985. 467 p.

RAFIQ, M.; FATIMA, T.; HUSNAIN, T.; BASHIR, K. RIAZUDDIN, S. Effect of different media on callus formation and regeneration of different genotypes of maize (*Zea mays* L.). **Plant Tissue Culture**, v. 15, p. 57-65, 2005.

RAMOS, R.S. **Efeito de reguladores de crescimento na embriogênese somática de cana-de-açúcar**. Viçosa, 2011. Dissertação (Mestrado) – UFV – Universidade Federal de Viçosa.

RICHARD, D.; LESCOT, M.; INZÉ, D.; DE VEYLDER, L. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 167-176, 2002.

RODRIGUEZ, S.; MONDEJAR, C.; RAMOS, M.E.; DIAZ, E.; MARIBONA, R.; ANCHETA, O. Sugarcane somatic embryogenesis: a scanning electron microscopy study. **Tissue & Cell**, v. 28, p. 149-154, 1995.

SAWAR, M.; SIDDIQUI, S.U. In vitro conservation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) germplasm. **Pakistan Journal of Botany**, v. 36, p. 549–556, 2004.

SHAH, A.H.; RASHID, N.; HAIDER, M.S.; SALEEM, F.; TAHIR, M.; IQBAL, J. An efficient, short and cost-effective regeneration system for transformation studies of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 609-614, 2009.

SHAHID, M.T.H.; KHAN, F.A.; SAEED, A.; FAREED, I. Variability of red rot-resistant somaclones of sugarcane genotype S97US297 assessed by RAPD and SSR. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 1831-1849, 2011.

SHOMEILI, M.; NABIPOUR, M.; MESKARBASHEE, M.; MEMARI, H.R. Evaluation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) somaclonal variants tolerance to salinity in vitro and in vivo cultures. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 9337-9343, 2011.

SILVA, M.M.A. **Embriogênese somática direta e indireta em cana-de-açúcar: busca de correlações com o estresse in vitro**. 2010, 75p. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regulation**, v. 44, p.147-156, 2004.

SINGH, G.; SANDHU, S.K.; MEETA, M.; SINGH, K.; GILL, R.; GOSAL, S.S. In vitro induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane. **Euphytica**, v. 160, p. 35-47, 2008.

SINHA, H.; GILL, M.; GOSAL., S. Regulation of somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 70, p. 181-183, 2000.

SNYMAN, S.J.; MEYER, G.M.; KOCH, A.C.; BANASIAK, M.; WATT, M.P. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 47, p. 234-249, 2011.

SNYMAN, S.J.; MEYER, G.M.; RICHARDS, J.M.; HARICHARAN, N.; RAMGAREEB, S.; HUCKETT, B.I. 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 Reports**, v. 25, p. 1016-1023, 2006.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J.B.R.; BALBUENA, T.S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* Biotechnology. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, p. 20-28, 2008.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

SUPRASANNA, P.; CHOUDHARY, R.S.; DESAI, N.S.; BAPAT, V.A. Regulation of somatic embryogenesis by plant growth regulators in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 7, p. 123-128, 2005.

SUPRASANNA, P.; MANJUNATHA, B.R.; PATADE, V.Y.; DESAI, N.S.; BAPAT, V.A. Profiling of culture-induced variation in sugarcane plants regenerated via direct and indirect somatic embryogenesis by using transposon- insertion polymorphism. **Sugar Tech**, v. 12, p. 26-30, 2010.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Santa-Maria: UFRGS, 2005. 182p.

VAN DER VYVER, C. Genetic transformation of the euploid *Saccharum officinarum* via direct and indirect embryogenesis. **Sugar Tech**, v. 12, p. 21-25, 2010.

WAMAITHA, M.J.; SUWA, K.; FUKUDA, K.I.; MII, M.; DAIMON, H.; MISHIBA, K.I. Thidiazuron-induced rapid shoot regeneration via embryo-like structure formation from shoot tip-derived callus culture of Sugarcane. **Plant Biotechnology**, v. 27, p. 365-368, 2010.

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.

ANEXO

Tabela 1. Quadro de análise de variância para indução de calos em folhas imaturas de cana-de-açúcar, cultivar RB867515.

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
Bloco	3	37.02474	12.34158	0.589
Auxinas	2	404.6328	202.3164	9.663 ***
Concentração	3	756.8893	252.2964	12.051
Linear R ² =0.91	1	689.3565	689.3565	32.926***
Quadrat. R ² =1.00	1	67.09505	67.09505	3.205 ^{N.S}
Cúbico R ² =1.00	1	0.4377604	0.4377604	0.021 ^{N.S}
Auxina*Conc	6	5.388021	0.8980035	0.043 ^{N.S}
Resíduo	33	690.8971	20.93628	

*** Significativo a 5% (P < 0,05)

Coefficiente de Variação = 5.9%

Tabela 2. Porcentagem média de formação de calos a partir de folhas imaturas através do uso de diferentes auxinas.

Auxinas	Médias
2,4-D	80.12 a
Picloram	78.94 a
Dicamba	73.50 b

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Quadro de análise de variância para indução de calos em ápices caulinares de cana-de-açúcar, cultivar RB867515.

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
Bloco	3	186.1354	62.04514	3.099
Auxinas	2	431.4557	215.7279	10.776***
Concentração	3	214.1563	71.38542	3.566
Linear R ² =0.95	1	202.5844	202.5844	10.120***
Quadrat. R ² =0.97	1	6.020833	6.020833	0.301 ^{N.S}
Cúbico R ² =1.00	1	5.551042	5.551042	0.277 ^{N.S}
Auxinas*Conc	6	55.61719	9.269531	0.463 ^{N.S}
Resíduo	33	660.6146	20.01862	

*** Significativo a 5% (P < 0,05)

Coefficiente de Variação = 4.8%

Tabela 4. Porcentagem média de formação de calos a partir de ápices caulinares através do uso de diferentes auxinas.

Auxinas	Médias
2,4-D	96,25 a
Picloram	92,94 ab
Dicamba	89,37 b

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Quadro de análise de variância para formação de calos embriogênicos a partir de folhas imaturas de cana-de-açúcar, cultivar RB867515.

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
Bloco	3	71.19271	23.73090	0.682
Auxinas	2	1486.065	743.0326	21.355***
Concentração	3	1543.734	514.5781	14.789
Linear R ² =0.90	1	1396.838	1396.838	40.146***
Quadrat. R ² =0.99	1	136.6875	136.6875	3.928 ^{N.S}
Cúbico R ² =1.00	1	10.20937	10.20937	0.293 ^{N.S}
Auxina*Conc	6	98.16406	16.36068	0.470 ^{N.S}
Resíduo	33	1148.214	34.79435	

*** Significativo a 5% (P < 0,05)

Coefficiente de Variação = 13.7%

Tabela 6. Porcentagem média de formação de calos embriogênicos a partir de folhas imaturas através do uso de diferentes auxinas.

Auxinas	Médias
2,4-D	49,75 a
Picloram	43,19 b
Dicamba	36,00 c

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7. Quadro de análise de variância para formação de calos embriogênicos a partir de ápices caulinares de cana-de-açúcar, cultivar RB867515.

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado		Quadrado Médio	F
Bloco	3	63.35417		21.11806	1.750
Auxinas	2	766.2214		383.1107	31.739
Auxinas* Concentr	6	626.1016		104.3503	8.645***
Concentr/A1	3	2383.766	Linear	2050.312	169.76***
			Quadrat.	324.000	26.82***
			Cúbico	9.453	0.70 ^{N.S}
Concentr/A2	3	765.6055	Linear	709.5383	58.75***
			Quadrat.	49.8789	4.13 ^{N.S}
			Cúbico	6.1882	0.5 ^{N.S}
Concentr/A3	3	249.1992	Linear	238.91	19.78***
			Quadrat.	0.66	0.05 ^{N.S}
			Cúbico	9.62	0.79 ^{N.S}
Resíduo	33	398.33		12.0771	

*** Significativo a 5% ($P < 0,05$)

Coefficiente de Variação = 7.428