

UFRRJ

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

DISSERTAÇÃO

**Calogênese e Embriogênese Somática de Cana-de-
açúcar, variedade RB867515: Otimização de
Protocolo**

Elizabeth Teixeira de Almeida Ramos

2014



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

**Calogênese e Embriogênese Somática de Cana-de-açúcar, variedade
RB867515: Otimização de Protocolo**

ELIZABETH TEIXEIRA DE ALMEIDA RAMOS

Sob a Orientação do Professor

Ederson da Conceição Jesus

e Co-orientação da Professora

Ana Lúcia Cunha Dornelles

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

Seropédica, RJ

Julho de 2014

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

ELIZABETH TEIXEIRA DE ALMEIDA RAMOS

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29 /07/2014

Ana Lúcia Cunha Dornelles. Dra. UFRRJ
(Co- Orientadora)

Carlos Frederico de Menezes Veiga. Dr. UFRRJ

Márcia Soares Vidal. Dra. EMBRAPA

AGRADECIMENTOS

À Deus, Força Maior que ampara e ilumina cada dia da minha vida.

Aos meus pais, minha base, por me acolherem com tanto amor nesta vida, mostrando-me a cada dia o que é ser uma família.

À minha irmã Suellen, por todo amor incondicional.

Ao Ever Grisol de Melo, pelo apoio em cada fase deste trabalho.

Aos meus amigos Jéssica Veronezze, Talita Aliaia, Leonardo Carfrei, Nayara Gonçalves, Roberto Rios, Janaína Gonçalves, Roberta Alencar, Camila Ferreira, Andrea Pereira, Tatiana Maia, que através de conversas descontraídas ajudaram-me a manter o ponto de equilíbrio!

Ao Uirá do Amaral, pela amizade e ajuda nos momentos de dificuldade.

Ao Willian Pereira pelas inúmeras doações de material vegetal.

À equipe da Biofábrica Campus Campos dos Goytacazes (Roberta Ribeiro, Verônica Coutinho, Prof^o Carlos Frederico Veiga), pelo aprendizado.

Ao Prof^o Valdir (*in memoriam*), pelos inúmeros puxões de orelha, que com certeza contribuíram ao meu desenvolvimento. Por ter sido o primeiro a acreditar em mim!

A todos os amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, por terem me acolhido, pelas conversas e momentos de descontração.

À Prof^a Ana Dornelles e ao Prof^o Maurício Ballesteiro, pela amizade, ajuda e paciência ao longo de toda orientação.

Ao meu orientador Ederson Jesus, por ter me acolhido e aberto as portas para novos aprendizados.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, em especial ao secretário Roberto Tadeu, pela amizade e dedicação.

À todos aqueles, que na impossibilidade de citar todos os nomes, me estimularam a continuar!
Muito Obrigada!!!

RESUMO

RAMOS, Elizabeth Teixeira de Almeida. **Calogênese e Embriogênese Somática de Cana-de-açúcar, variedade RB867515: Otimização de Protocolo**. 2014. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

A cana-de-açúcar é uma das culturas de maior importância para o Brasil, que atualmente lidera o ranking de produção e exportação de açúcar e etanol. Objetivando o aumento dessas exportações, pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando a obtenção de cultivares com características de interesse agrônomo como resistência a estresses bióticos e abióticos. Para suprir essa demanda por variedades mais produtivas e resistentes tem se buscado, além dos métodos de melhoramento genético tradicional, ferramentas biotecnológicas como a transformação genética, e para que esta seja bem sucedida é necessário o estabelecimento de protocolos eficientes para embriogênese somática, produzindo desta forma as células alvo mais adequadas para esse procedimento. O presente trabalho teve como objetivo (1) testar diferentes protocolos de desinfestação para introdução dos explantes *in vitro*, (2) avaliar a indução de diferentes tipos de explantes, (3) analisar tipos de meio de cultura e reguladores de crescimento nas etapas da embriogênese somática de cana-de-açúcar, cultivar RB867515. Foram realizados ensaios preliminares com três tipos de explantes (brotações, meristema e ápices caulinares) e diferentes protocolos de desinfestação envolvendo etapas de imersão em hipoclorito de sódio (1,25%), álcool 70%, bicloreto de mercúrio e fungicida (Cercobin) com e sem aplicação de vácuo, antes da inoculação destes *in vitro*. Em sequência foi verificada a indução de calos de brotações de ápice e base em meio MS com 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. A seguir foram avaliados ápices caulinares de plantas micropropagadas em meios de indução de calos com e sem a suplementação de água de coco, além das quatro concentrações de 2,4-D já citadas. Os calos formados no meio de indução foram transferidos para meio de multiplicação contendo 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D sem a suplementação de água de coco, recebendo ou não a adição de 4 mg.L⁻¹ de AIA, visando maior obtenção de área embriogênica. Para a etapa de regeneração foram avaliados o meio MS basal, sem suplementação, ou o mesmo meio com a adição de 1 mg.L⁻¹ de BAP e GA₃. Após a obtenção de plantas, foi avaliada a eficiência do carvão ativado na indução de raízes. Nos tratamentos de desinfestação, obteve-se maior eficiência de descontaminação e indução dos explantes, utilizando-se etapas com hipoclorito de sódio (1,25%) e álcool 70%. Para indução de calos em brotações não foi encontrada diferença na origem (ápice ou base) e nas concentrações de 2,4-D utilizadas. Na indução de ápices caulinares, o uso de 2,4-D na concentração de 3 mg.L⁻¹ apresentou a melhor indução de calos para essa cultivar. A multiplicação de áreas embriogênicas com maior intensidade foi alcançada em meio sem suplementação de AIA. Os resultados satisfatórios para regeneração de plantas foram em meio sem suplementação de reguladores de crescimento. O carvão ativado foi benéfico à rizogênese. Estes resultados permitiram a elaboração de uma proposta de protocolo para indução de calos e regeneração de plantas a partir destes para a cultivar RB867515.

Palavras-chave: otimização de protocolo, regeneração de plantas, calos embriogênicos

ABSTRACT

RAMOS, Elizabeth Teixeira de Almeida. **Somatic embryogenesis and organogenesis of sugarcane variety RB867515: Protocol Optimization**. July, 2014. 53 p. Dissertation (Master in Plant Health and Applied Biotechnology). Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

The sugarcane is a crop of major importance for Brazil, which currently leads the ranking of production and export of sugar and ethanol. Research has been developed in order to obtain new cultivars with desirable agronomic characteristics such as resistance to biotic and abiotic stresses. In addition to traditional breeding methods, biotechnological tools such as genetic transformation have been developed in order to meet this demand for more productive and resistant varieties. The establishment of efficient protocols for somatic embryogenesis, thereby producing more appropriate target cells for this procedure, is a key point to the success of the biotechnological approach. The present study aimed to (1) test different disinfection protocols for the *in vitro* introduction of explants; (2) evaluate the induction of somatic embryogenesis in different types of explants; and (3) analyse the influence of different culture media and growth regulators on the steps of somatic embryogenesis of sugarcane, cv. RB867515. Preliminary tests with three different explants (shoots, meristem and shoot tips) and different disinfection protocols were performed. The disinfection protocols involved the immersion of explants in sodium hypochlorite (1.25%), 70% ethanol, mercuric chloride, or fungicide (Cercobin, with and without vacuuming). The frequency of callus induction from the shoot apex and base on MS medium with 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 mg.L⁻¹ of 2,4-D was evaluated. The frequency of callus induction from the apexes of micro propagated plants in media with and without supplementation of coconut water and the four aforementioned 2,4-D concentrations were evaluated as well. The calli formed in the induction media were transferred to multiplication media containing 3.0 mg.L⁻¹ of 2,4-D with or without IAA (4 mg.L⁻¹) and without the supplementation of coconut water, aiming to increase the embryogenic area. For the regeneration step, MS basal media with and without 1 mg.L⁻¹ BAP and GA₃ were evaluated. After plants obtaining, the efficiency of the activated charcoal in the roots induction was evaluated. In disinfection treatments, the decontamination and explants induction were more efficient when sodium hypochlorite (1.25%) and 70% ethanol were applied in the disinfection procedure. No difference was observed in the callus induction originated from either the apex or the base of shoots at all concentrations of 2,4-D. The use of 2,4-D at a concentration of 3 mg.L⁻¹ provided the best callus induction from shoot apexes. The greater intensity multiplication of embryogenic areas was achieved with the medium without the supplementation of IAA. Satisfactory results for plant regeneration were observed in the medium without the supplementation of growth regulators. The activated charcoal was beneficial to rooting.

Keywords: protocol of optimization, plants regeneration, embryogenic callus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção brasileira de cana-de-açúcar a partir da safra 2007/2008 (CONAB, 2013)	4
Figura 2: Segmento nodal com gema desenvolvida medindo aproximadamente 5,0 cm. Seropédica 2013	9
Figura 3: Toletes de cana-de-açúcar da variedade RB867515 antes de serem encobertos pelo substrato e alocados em casa de vegetação. Seropédica, 2013.....	11
Figura 4: Placa contendo ápices caulinares em meio para indução de calos. Seropédica, 2014	12
Figura 5: Plantas regeneradas em meio de enraizamento. A) Meio suplementado com 0,1 mg.L ⁻¹ de ANA. B) Meio suplementado com 0,1 mg.L ⁻¹ de ANA e 0,03% de carvão ativo. Seropédica 2014	15
Figura 6: Planta regenerada em recipiente coberto, visando melhor aclimatização. Seropédica, 2014	15
Figura 7: Peso dos calos em função de diferentes concentrações de 2,4-D.	18
Figura 8: Tamanho (cm ²) dos calos formados em meio contendo água de coco (Ac1) e sem água de coco (Ac0) em diferentes concentrações de 2,4-D.....	19
Figura 9: Avaliação da embriogênese somática de calos em meio contendo água de coco (Ac1) e sem água de coco (Ac0) em diferentes concentrações de 2,4-D	20
Figura 10: Diferentes tipos de calos. A) Calo embriogênico com aspecto duro e compacto, B) Calo não embriogênico macio, friável e translúcido, C) Calo não embriogênico macio, mucilaginoso e brilhante, D) Calo misto com tecido não embriogênico coberto com porções embriogênicas. Seropédica, 2014.	21
Figura 11: Tamanho (cm ²) dos calos formados de acordo com diferentes concentrações de 2,4-D ao longo de 56 dias de avaliação.	22
Figura 12: Desenvolvimento da área embriogênica (cm ²) dos calos originados de três diferentes meio de indução ao longo das avaliações (T1: 3,0 mg. L ⁻¹ de 2,4-D com suplementação de água de coco/ R ² : 0,9531; T2: 3,0 mg. L ⁻¹ de 2,4-D sem suplementação de água de coco/R ² : 0,9209; T3: 4,0 mg. L ⁻¹ de 2,4-D sem suplementação de água de coco).....	24
Figura 13: Calos com crescimento estagnado, originados de meio indução com 4,0 mg. L ⁻¹ de 2,4-D sem suplementação de água de coco, em fase de multiplicação. Seropédica, 2014	25
Figura 14: Regeneração de calos em plantas ao longo do período de avaliação. A) 7 dias; B) 14 dias; C) 21 dias; D) 28 dias; E) 35 dias; F) 60 dias. Seropédica, 2014	25
Figura 15: Calos apresentando pigmentos de antocianina. Seropédica, 2014	26
Figura 16: Plantas regeneradas após 30 dias em meio de regeneração. A) Plantas com alteração da parte aérea, regeneradas em meio com suplementação de 1 mg. L ⁻¹ de BAP e 1 mg. L ⁻¹ de GA ₃ . B) Plantas regeneradas em meio sem reguladores de crescimento sem alterações morfológicas. Seropédica, 2014	27
Figura 17: Plantas regeneradas após 60 dias de permanência em meio de regeneração sem reguladores de crescimento. Seropédica, 2014.....	27
Figura 18: Efeito da suplementação com carvão ativado sobre plantas regeneradas de cana-de-açúcar. A) e B) Plantas enraizadas em meio contendo 0,03% de carvão ativado. C) e D) Plantas enraizadas em meio sem a suplementação de carvão ativado. Seropédica, 2014.....	29
Figura 19: Plantas regeneradas de cana-de-açúcar sob aclimatação em substrato. Seropédica, 2014	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escala de notas desenvolvidas para acompanhamento da indução de calos de cana-de-açúcar.....	13
Tabela 2: Escala de notas desenvolvidas para acompanhamento do desenvolvimento da área embriogênica em calos de cana-de-açúcar.	14
Tabela 3: Efeito dos tratamentos de desinfestação na porcentagem de contaminação e indução de calos oriundos de brotações de cana-de-açúcar	16
Tabela 4: Efeito dos tratamentos de desinfestação na porcentagem de contaminação e indução de calos oriundos de meristemas caulinares de cana-de-açúcar	17
Tabela 5: Média da área de calos em diferentes doses de 2,4-D (mg.L ⁻¹)	21
Tabela 6: Percentual de regeneração dos calos em meio de regeneração de acordo com os tipos de meio utilizados (MS basal e MS+ 1 mg. L ⁻¹ BAP+ 1 mg. L ⁻¹ GA ₃).....	26
Tabela 7: Dados complementares referentes à média do escaneamento de três plantas de cada tratamento. (T1: 0,1 mg.L ⁻¹ de ANA e 0,03% de carvão ativado; T2 0,1 mg.L ⁻¹ de ANA sem a suplementação de carvão ativado)	28

LISTA DE SUPLEMENTOS

Suplemento 1: Quadro de análise de variância para formação de calos a partir de brotações de ápice e base de cana-de-açúcar, cv. RB867515	39
Suplemento 2: Quadro de análise de variância para área de calos originados de ápices caulinares formados em meio com e sem suplementação de água de coco e quatro concentrações de 2,4-D (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L ⁻¹)	39
Suplemento 3: Quadro de análise de variância para sistema de notas dos calos originados de ápices caulinares formados em meio com e sem suplementação de água de coco e quatro concentrações de 2,4-D (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L ⁻¹)	40
Suplemento 4 : Quadro de análise de variância para formação da área embriogênica de calos originados de ápices caulinares desenvolvidos em meio de multiplicação com e sem a suplementação de AIA (4,0 mg.L ⁻¹)	41
Suplemento 5: Quadro de análise de variância do sistema de notas desenvolvidas para análise da área embriogênica de calos originados de ápices caulinares desenvolvidos em meio de multiplicação com e sem a suplementação de AIA (4,0 mg.L ⁻¹)	41
Suplemento 6: Quadro de análise de variância para regeneração de plantas originadas de calos de ápices caulinares	42

LISTA DE ABREVIATURAS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
RIDESA	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento Sucroalcooleiro
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
DICAMBA	Ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzóico
CPA	Ácido 4-clorofenoxiacético
AIA	Ácido Indolacético
BAP	Benzilaminopurina
GA₃	Ácido Giberélico
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
PVP	Polivinilpirrolidona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. A Cultura de Cana-de-Açúcar	3
3.2. O Melhoramento Genético na Cana-de-Açúcar	5
3.3. Cultivo <i>In vitro</i>	6
3.4. Embriogênese somática	7
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1. Local de Realização e Material Vegetal	9
4.2. Tipos de Explantes e Desinfestação	9
4.2.1. Brotações de ápice e base originadas do campo.....	9
4.2.2. Meristemas caulinares originados do campo.....	10
4.2.3. Ápice Caulinar (Plantas estabelecidas <i>in vitro</i>).....	11
4.3. Indução da Embriogênese Somática.....	12
4.4. Multiplicação das Culturas Embriogênicas	13
4.4. Regeneração de Plantas	14
4.5. Enraizamento	14
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	16
5.1. Desinfestação.....	16
5.2. Indução da Embriogênese Somática.....	18
5.2.1. Brotações de ápice e base	18
5.2.2. Ápices Caulinares	19
5.3. Multiplicação das Culturas Embriogênicas	23
5.4. Regeneração de Plantas	25
5.5. Enraizamento	28
5.6. Protocolo.....	30
5.6.1. Desinfestação.....	30
5.6.2. Indução e Multiplicação da Embriogênese Somática.....	31
5.6.3. Regeneração de Plantas	31
5.6.4. Enraizamento e Aclimatização das plantas	31
6. CONCLUSÕES.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

A cultura de cana-de-açúcar, desde sua introdução no período colonial, tem sido uma das principais culturas da economia brasileira. Atualmente o Brasil não ocupa apenas o posto de maior produtor de açúcar e etanol, mas também conquista cada vez mais o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética.

Responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, o país tem a previsão de alcançar uma média de aumento na produção de aproximadamente 3,25% em 2018/2019, sendo colhidas 47,34 milhões de toneladas do produto. Isso representa, com relação à safra de 2007/2008, um aumento de 14,6 milhões de toneladas na produção (MAPA, 2014).

Apesar da importância do Brasil relacionada à cultura e sua crescente expansão, o melhoramento clássico não tem conseguido acompanhar esse crescimento acelerado gerado pelo aumento na demanda de variedades mais produtivas, tolerantes aos problemas fitossanitários e mais adaptáveis às regiões de fronteira agrícola, onde as condições edafoclimáticas são desfavoráveis.

A dificuldade encontrada para o lançamento de novas variedades está relacionada à complexidade do genoma da planta, octaplóide, aneuplóide com 80 a 130 cromossomos que segregam multivalentes (D'HONT, 2008). Apesar das dificuldades atribuídas ao genoma da planta, o melhoramento genético convencional atua como o principal responsável pela incorporação de características de interesse agrônomo nas atuais variedades de cana-de-açúcar. Para manter o crescente desenvolvimento econômico aliado à cultura é fundamental atender à demanda por novos e promissores clones.

É nesse contexto que a utilização de técnicas de cultura de tecido e de engenharia genética como ferramentas proporcionam chances de introduzir características de interesse agrônomo. Apesar das dificuldades aliadas ao genoma complexo, a cana-de-açúcar possui características que a tornam uma boa candidata para o melhoramento através da transformação, possibilitando a multiplicação do material vegetal por meio da micropropagação.

Assim, o entendimento das fases de calogênese e embriogênese somática, que permita uma maior eficiência da regeneração de plantas para a espécie, torna-se importante, ampliando as possibilidades de uma efetiva exploração da tecnologia dos transgênicos.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Otimização do protocolo de calogênese, embriogênese somática e regeneração de plantas de cana-de-açúcar, cv. RB867515.

Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo eficiente de desinfestação de explantes;
- Avaliar a indução de calos em diferentes tipos de explantes e,
- Avaliar a composição dos meios de indução de calos, multiplicação de culturas embriogênicas, regeneração de plantas e enraizamento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A Cultura de Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum* spp., é uma planta alógama, pertencente ao gênero *Saccharum*, família Poaceae. Sua origem foi determinada no sudeste da Ásia, nas regiões compreendidas entre a Indonésia e Nova Guiné (DANIELS e ROACH, 1987).

Após todas as revisões taxonômicas, o sistema de classificação mais aceito originou a expressão “Complexo *Saccharum*”. Este, é constituído pelas espécies do gênero *Saccharum* (*S. spontaneum* (2n=40-128) e *S. robustum* (2n=60-205), *Saccharum officinarum* (2n=80), *S. sinense* (2n=81-124), *S. barberi* (2n=111-120) e *S. edule* (2n=60-80)) e pelos gêneros relacionados filogeneticamente (*Erianthus* seção *Ripidium*; *Sclerostachya*; *Narenga*; e *Miscanthus* seção *Diandra*) (DANIELS e ROACH, 1987).

A hipótese de base da origem genética do complexo *Saccharum* se fundamenta na existência de um ancestral comum. Estudos pioneiros como em Parthasarathy (1948) avaliando a progênie de cruzamentos realizados entre plantas *S. officinarum* e *Sclerostachya* (plantas com número cromossomal básico de $x = 10$) mostram que 50% dos cromossomos básicos existentes nas duas espécies são comuns, sugerindo então a existência de um ancestral único de número cromossômico básico de $x = 5$.

Aceita-se que plantas de *S. edule* e *S. officinarum* tem origem a partir de seleção natural de populações selvagens de *S. robustum*. Já *S. barberi* e *S. sinense*, acredita-se serem derivadas da hibridação natural de *S. officinarum* e *S. spontaneum* (LANDELL e BRESSIANI, 2008).

A espécie *S. spontaneum* é tida como complexa e altamente polimórfica. Ela possui citótipos com número cromossômico diploide (2n) que varia de 40 a 128 com número básico $x=8$ (ou seja, todos os indivíduos da espécie são poliplóides) (RAO e BABU, 1955).

A espécie *S. officinarum* possui número cromossômico $2n=80$, com $x=10$, ou seja, todos os indivíduos que compõe a espécie são octaplóides – possuem oito cópias de cada um dos dez cromossomos (PRICE, 1963).

As cultivares atuais são resultado de hibridação interespecífica entre *S. officinarum*, a “cana nobre”, e a selvagem *S. spontaneum*, contendo de 100 a 130 cromossomos, dos quais 80% são provenientes de *S. officinarum*, 10% de *S. spontaneum* e 10% de cromossomos recombinantes. (D’HONT, 2005). A espécie *S. officinarum* contribui geneticamente com o alto acúmulo de açúcar no caule (com porcentagem de sacarose entre 7-22%), enquanto a rusticidade na adaptação às diversas condições, resistência à pragas e doenças são atribuídas à *S. spontaneum*.

Em função da complexidade relacionada a esse genoma altamente poliploide, muito do progresso relacionado à cultura tem sido atribuído ao melhoramento convencional (LAKSHMANAN et al., 2005). Por se tratar de um processo demorado, com resultados originados a longo prazo (de 12 a 15 anos para lançamento de uma nova cultivar), maiores estudos sobre a cultura, tornam-se necessários, sobretudo o melhor entendimento do processo de embriogênese somática, sendo este a base para aliar o melhoramento convencional ao molecular.

O potencial de produção e o papel fundamental da cana-de-açúcar e seus subprodutos, tanto do ponto de vista agrícola, quanto industrial, fazem essa cultura ser de incontestável importância para o Brasil, que atualmente ocupa o posto líder de produção de açúcar e álcool, assim como lidera a exportação desses produtos. De acordo com as previsões para a safra de 2013/2014 dadas pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), a área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira está em torno de 8.810,79 mil hectares, distribuídos em todos os estados produtores. Para essa

temporada de 2013/2014, o setor canavieiro continua em expansão, recebendo um acréscimo de 325,8 mil hectares (Figura 1). De acordo com as projeções, o total de cana a ser moída na safra 2013/2014 é de 659,850 milhões de toneladas.

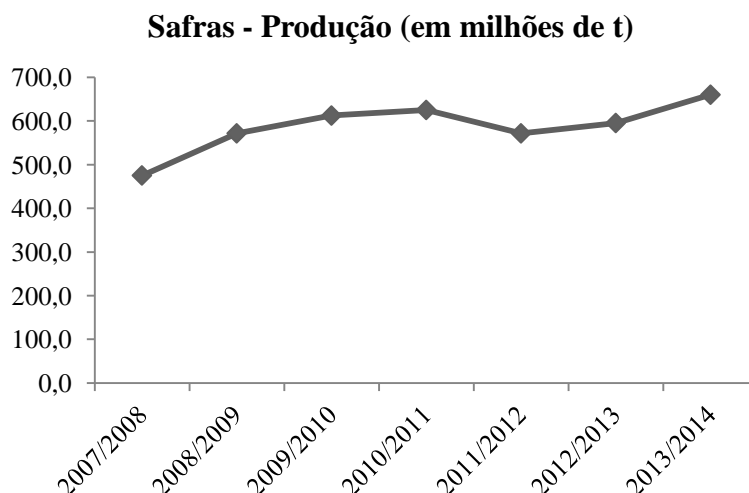


Figura 1: Produção brasileira de cana-de-açúcar a partir da safra 2007/2008 (CONAB, 2013)

A representatividade da cultura canavieira na economia brasileira traz ótimos reflexos para o país, tanto em âmbito nacional quanto internacional. Apesar da relevância da produção de açúcar, com 304,24 milhões de toneladas previstas para esta mesma safra, o principal propulsor do setor é o álcool, com 355,8 milhões de toneladas de cana destinadas à produção (CONAB, 2013), em resposta a crescente preocupação das economias mundiais com a dependência relacionada com o uso de combustíveis fósseis, além da crescente atenção voltada para a redução das emissões de dióxido de carbono (CO₂), responsável pela intensificação do aquecimento global (KIYOTA et al., 2012).

Além disso, o aumento pela demanda interna de álcool, frente à crescente produção de veículos flex e a valorização do combustível brasileiro no cenário internacional impulsionam o crescimento do setor sucroalcooleiro nacional (LEITE et al., 2009). Dessa forma, a integração de estratégias de melhoramento convencional e ferramentas moleculares pode garantir a permanência do país na liderança de produção.

No cenário atual, cerca de 62% das variedades plantadas e cultivadas no Brasil foram desenvolvidas pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA. Dentre elas está a cultivar RB867515, lançada em 1988 pela Universidade Federal de Viçosa. Esta possui ótima adaptabilidade e estabilidade de produção em solos de baixa fertilidade, alta produção, alto teor de sacarose e é tolerante às principais doenças de importância econômica na cultura, como ferrugem e mosaico. A principal carência desta variedade é a sua suscetibilidade à estria vermelha.

Devido às suas características agrônomicas favoráveis, esta cultivar se mantém como preferência, ocupando atualmente 25% de todo território ligado à cultura (PMGCA, 2014). Isto a torna um ponto de partida importante para os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, principalmente no Brasil.

3.2. O Melhoramento Genético na Cana-de-Açúcar

O melhoramento genético no sistema convencional até o momento tem contribuído com a totalidade das variedades de cana-de-açúcar plantadas no Brasil. Um dos programas de melhoramento que mais tem contribuído com novas cultivares é o da RIDESA que em conjunto detém a maior área plantada no país, sendo todas suas variedades lançadas derivadas de cruzamentos (CARNEIRO, 2008) no entanto, os programas de melhoramento enfrentam grandes dificuldades para a obtenção de variedades de melhor performance produtiva, a exemplo da RB 867515 que foi lançada a mais de 20 anos (CONAB, 2012). Estas dificuldades decorrem, como mencionado anteriormente, da complexidade relacionada ao genoma da planta, octaplóide, aneuplóide com 80 a 130 cromossomos que segregam em multivalentes, onde os cromossomos homólogos se pareiam todos juntos dentro de uma mesma classe de homologia, sendo identificado principalmente nos autopoliplóides, que normalmente ocorre em cana-de-açúcar (D'HONT, 2008).

O elevado grau de duplicações de locos, genes e variabilidade gênica, afeta a expressão fenotípica, pois mesmo características monogênicas apresentam comportamento semelhante a características quantitativas. Desta forma, o surgimento de novas combinações alélicas, que proporcionem condições para a obtenção de melhores variedades, mais estáveis e mais produtivas é uma tarefa complexa e pouco frutífera, uma vez que apenas uma variedade pode ser selecionada a cada 250 mil plântulas (informações pessoais, Marcio Barbosa: RIDESA/UFV).

A utilização de técnicas de cultura de tecido e de engenharia genética como ferramentas, proporcionam chances de introduzir características de interesse agrônomo, de resistência ao estresse biótico e abiótico. O primeiro relato com sucesso de transformação genética em cana-de-açúcar, com regeneração de plantas, foi com o estudo de Bower e Birch (1992), por meio da técnica de biolística. As plantas regeneradas com transformação positiva continham o gene *neo*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II, a qual confere resistência aos antibióticos canamicina e geneticina.

Outro estudo pioneiro é o de Arencibia et al. (1997), com o desenvolvimento de plantas resistentes a insetos, através da inserção do gene truncado de *cryI(A)b* de *Bacillus thuringiensis*. Porém, as plantas apresentaram baixa expressão proteica e resposta larvicida parcial sendo então melhorada pelos mesmos autores em 2004.

Inúmeros estudos já foram realizados, a fim de estabelecer métodos eficientes para transformação (OBREGÉN et al., 1997; ARENCIBIA et al., 1998; INGELBRECHT et al., 1999; DOWNING et al., 2000; KHALIL, 2001; BRAGA et al., 2003; ARENCIBIA e CARMONA, 2006; MAYAVAN, 2013; NASIR, 2014). Dentre esses estudos, diferentes técnicas já foram empregadas com relativo sucesso na regeneração de plantas transformadas, as quais são representadas pelo bombardeamento de microprojéteis (FRANKS e BIRCH, 1991; INGELBRECHT et al., 1999; SNYMAN et al., 2006; PASSARIN, 2009; PICELLI, 2011), eletroporação (RATHUS e BIRCH, 1992; ARENCIBIA et al., 1995), tratamento com polietilenoglicol (PEG) (CHEN, 1987) e *Agrobacterium tumefaciens* (ARENCIBIA, 1998; MANICKAVASAGAM et al., 2004; ARENCIBIA e CARMONA, 2006; WAKASA et al., 2012; OZAWA, 2012; MAYAVAN, 2013).

Dentre os métodos de transformação genética, a biolística tem sido considerada o principal método de transformação de cana-de-açúcar (PICELLI, 2011). De acordo com Lakshmanan et al. (2006), um fator importante para o sucesso da transformação é a escolha do tecido alvo e a capacidade desse tecido em regenerar plantas. Isso faz com que calos embriogênicos tornem-se bons candidatos ao procedimento, pois além de serem considerados ótimos alvos de bombardeamento, possuem alta capacidade em regenerar plantas.

O maior entendimento da embriogênese somática de cana também beneficia o método de transformação por meio da agroinfecção, uma vez que a chance de sucesso de obtenção de plantas transformadas depende de protocolos bem estabelecidos.

A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, tem se tornado um procedimento de transferência de genes via transformação genética cada vez mais comum (MANICKAVASAGAM et al., 2004; ARENCIBIA e CARMONA, 2006; PASSARIN, 2009; ARVINTH et al., 2010; ELDESSOKY et al., 2011; WAKASA et al., 2012; OZAWA, 2012; MAYAVAN, 2013), especialmente para monocotiledôneas.

Sugere-se que os métodos baseados em agroinfiltração podem ser uma boa estratégia, uma vez que permitem controlar mais eficientemente a integração do inserto no genoma, facilidade de manipulação, menor custo, permitindo que o mesmo possa ser praticado em pequenos laboratórios. Este método de transformação genética oferece algumas vantagens em comparação com os métodos diretos, dentre elas estão: simplicidade do procedimento, economicidade e eficiência, além de transferir segmentos de DNA relativamente grandes com pouco rearranjo e integração de baixos números de cópias do gene no cromossomos de plantas (MELO, 2011).

Deste modo, a baixa capacidade das monocotiledôneas em hospedar naturalmente a *Agrobacterium*, passou de um obstáculo, para um detalhe com os avanços na otimização do processo de agroinfecção (ARENCIBIA e CARMONA, 2006; NISHIMURA et al., 2007; ISHIDA et al., 2007).

3.3. Cultivo *In vitro*

As técnicas de cultura de tecidos de plantas tornaram-se uma ferramenta poderosa para estudar e resolver problemas básicos aplicados à biotecnologia vegetal, sobretudo para o melhoramento de plantas geneticamente complexas, como a cana-de-açúcar. Devido sua origem multiespecífica (*Saccharum officinarum* x *Saccharum spontaneum*), cada cultivar responde de forma diferente, tanto no campo quanto *in vitro*, onde a influência do genótipo é determinante (MELLO, 2011). Apesar desses obstáculos, muitos avanços significativos têm sido alcançados através das modernas ferramentas biotecnológicas, como a micropropagação através de cultura de calos (BEHERA e SAHOO, 2009), variação somaclonal (KHAN et al., 2012), conservação de germoplasma (SARWAR e SIDDIQUI, 2004; SUPRASANNA et al., 2011) e transformação genética (ARENCIBIA e CARMONA, 2006; PICELLI, 2010).

No cultivo *in vitro*, pode-se ter a regeneração de plantas por meio de duas rotas morfogênicas: embriogênese somática (WAMAITHA et al., 2010; PICELLI, 2011) e organogênese (ELDESSOKY et al., 2011; YASMIN, 2012), ou pela integração de ambas as vias morfogênicas (LAKSHMANAN et al., 2006). Entretanto, a embriogênese somática, tem sido reportada como a via morfogênica mais utilizada para pesquisas envolvendo cana-de-açúcar, pois além de viabilizar a multiplicação de genótipos superiores, constitui-se em uma ferramenta útil para estudos dos processos fisiológicos e bioquímicos (LAKSHMANAN et al., 2005).

A embriogênese somática é o processo em que células somáticas se diferenciam em embriões somáticos. Estes se assemelham morfológicamente a embriões zigóticos, dando origem a uma planta, sem haver a fusão de gametas (ARNOLD, 2008). Este processo é observado em dois modelos: uma via direta, na qual os embriões somáticos se desenvolvem a partir de explantes de tecidos, sem a formação intermediária de calos (SNYMAN et al., 2006) e uma via indireta na qual há um estágio intermediário de formação calosa. Os calos são constituídos por células totipotentes, que podem adquirir novas competências dependendo do estímulo dado por mensageiros específicos (ARNOLD, 2008).

3.4. Embriogênese somática

Estudos envolvendo a embriogênese somática tiveram início em 1958, com as pesquisas de Steward e colaboradores, e continuam sendo objeto de estudo, devido a sua grande importância. Como mencionado anteriormente, a embriogênese somática é um processo semelhante à embriogênese zigótica, no qual uma ou um grupo de células somáticas, são precursores da formação de embriões somáticos (FALCO et al., 1996). Neste processo, características dos estágios embrionários podem ser observados, mesmo não havendo a fusão de gametas (JIMÉNEZ, 2001).

Em função do alto grau de similaridade entre a embriogênese somática e zigótica, a exemplo da morfologia do embrião, padrão de expressão de genes e proteínas, qualifica-se como modelo efetivo a embriogênese somática, a fim de esclarecer os diferentes estágios de desenvolvimento do embrião (ZIMMERMAN, 1993).

Os benefícios ligados ao maior entendimento da embriogênese somática, além da obtenção de um modelo de referência para estudos em fisiologia e bioquímica, também favorecem a propagação clonal, visando a conservação e o melhoramento genético das espécies (STEINER et al., 2008). Outra vantagem ligada a este processo é o rendimento de grande quantidade de propágulos a partir de um pequeno número de explantes (FILIPPI, 2001). A acessibilidade aos embriões somáticos é maior quando comparada aos embriões zigóticos, uma vez que estes são ligados ao tecido materno (MARSONI, 2008). Tido isto como vantagem, a habilidade para induzir a embriogênese somática, formou a base para uma efetiva exploração da engenharia genética para o melhoramento de cana-de-açúcar (LAKSHMANAN, 2005).

São observados dois padrões básicos de desenvolvimento na embriogênese somática: um que ocorre de maneira direta, chamado de embriogênese somática direta (ESD) – neste modelo os embriões somáticos são originados a partir de tecidos matrizes sem a formação do estágio intermediário de calos, e o modelo indireto, nomeado embriogênese somática indireta (ESI), no qual ocorre uma formação intermediária de uma estrutura constituída por células com pouca ou nenhuma determinação, denominada calo (GUERRA et al., 1999)

O processo de embriogênese somática pode ser dividido em diferentes etapas: indução de calos, multiplicação das culturas embriogênicas, maturação e regeneração (KLIMASZEWSKA, 2010). A indução de calos embriogênicos é uma das principais etapas no processo de embriogênese somática. Vários são os fatores que afetam a indução de culturas embriogênicas: tipo do explante, estágio de desenvolvimento, condições fisiológicas da planta matriz, composição e balanço hormonal do meio de cultura, genótipo da planta (JIMÉNEZ, 2001).

Esta etapa é estabelecida através do uso de reguladores de crescimento, principalmente auxinas e citocininas. As auxinas auxiliam na extensibilidade da parede celular através do estímulo dado à sua acidificação e induzem a transcrição de mRNA que codificam proteínas associadas ao crescimento celular. As citocininas regulam vários aspectos do crescimento, incluindo divisão celular, dominância apical, formação/regeneração de tecidos e desenvolvimento vascular (KERBAUY, 2004).

Várias análises foram realizadas a fim de determinar a eficiência de indução de calos de cana-de-açúcar com diferentes auxinas, como Ramos (2011), onde foram testados 2,4-D, Dicamba e CPA nas concentrações 1,1; 2,2; 3,3 e 4,4 mg.L⁻¹. Foi verificado após 30 dias de indução que a auxina responsável pela maior porcentagem de indução de calos embriogênicos foi o 2,4-D na concentração de 4,4 mg.L⁻¹. Assim como neste trabalho, outros estudos atribuem ao 2,4-D a melhor indução de calos embriogênicos de cana-de-açúcar (NIEVES et al., 2008; ASAD et al., 2009; MACEDO, 2010; SILVA, 2010; BASNAYAKE et al., 2011).

Outro fator que merece destaque é a suplementação do meio de indução de calos com água de coco. Apesar de sua constituição não ser padronizada, pesquisas vêm demonstrando que a presença de citocininas naturais aumenta significativamente a indução de calos em cana-de-açúcar (PASSARIN, 2009; PICELLI, 2010; ROY, 2011). Picelli (2010) testou a eficiência da adição de água de coco nos meios de indução e alternativamente ao seu uso, também analisou a suplementação do meio com cinetina. Como resultado obteve maior número de calos embriogênicos nos explantes cultivados em meio de cultura com suplementação de água de coco.

A multiplicação das culturas embriogênicas também é uma etapa muito importante, uma vez que permite a produção de material clonal em larga escala (MELO, 2011). Ao longo desta etapa, alguns estudos têm avaliado a influência da adição do AIA em função da multiplicação das culturas embriogênicas (RAMOS, 2011; MELO, 2011). De acordo com Kong et al. (1997) o AIA é importante nos eventos de diferenciação e no estabelecimento da simetria bilateral dos embriões. Nos estudos de Dudis et al. (1995) é demonstrado que o 2,4-D e os níveis endógenos de AIA estão correlacionados, resultando na alteração do metabolismo das auxinas, o que pode contribuir para a multiplicação dos calos embriogênicos.

Embora pouco se saiba sobre os processos bioquímicos e moleculares que ocorrem quando células somáticas tornam-se competentes para produzir embriões somáticos, é possível diferenciar morfológicamente os tipos de calo, uma vez que o resultado de culturas do ciclo de indução e multiplicação podem possuir capacidade embriogênica distinta (NIEVES, 2003). De acordo com os estudos de Lakshmanan (2006), existem três tipos morfológicos de calos de cana-de-açúcar, com distintos potenciais morfogênicos: 1) Calos com aspecto duro, compacto e com alta capacidade embriogênica, 2) macio, friável, translúcido, mas não embriogênico, 3) macio, mucilaginoso, brilhante e não embriogênico. Além desses, ainda é relatado o tipo intermediário com tecido não embriogênico coberto com porções embriogênicas (GANDONOU et al., 2005). Segundo Basnayake et al., (2011), as características morfológicas dos calos são excelentes indicadores da capacidade de regeneração.

Nas culturas embriogênicas o crescimento e a atividade metabólica são maiores, enquanto que em calos não embriogênicos o crescimento apresenta-se mais lento. Nesse contexto, os calos embriogênicos apresentam maior conteúdo de prolina, proteínas solúveis e atividade proteolítica, quando comparados aos calos não embriogênicos (NIEVES et al. 2003)

O processo de embriogênese somática termina com a regeneração dos calos embriogênicos maduros em plantas. A regeneração ocorre geralmente em meios desprovidos de reguladores de crescimento, porém tem sido mostrada uma potencialização deste processo através da adição de diferentes reguladores (CHENGALRAYAN e GALLO-MEAGHER, 2001; ALI et al., 2008; PICELLI, 2010; WAMAITHA et al., 2010).

No trabalho realizado por Picelli et al (2010) ao ser avaliada a aplicação exógena dos peptídeos hormonais sintéticos CLV3 e PSK- α foi verificado um aumento na regeneração das plantas, indicando que a suplementação do meio com esses reguladores pode ter estimulado as células meristemáticas a seguirem uma rota de diferenciação, levando a maior formação dos primórdios foliares e posteriormente aumento das brotações formadas. Já nos estudos de Ramos (2011) e Melo (2011), foi alcançado maior potencial de regeneração com a adição de BAP e GA₃ no meio de cultura.

Considerando-se que a resposta morfogênica é altamente influenciada pelo genótipo, para qualquer etapa do ciclo (indução, multiplicação, maturação ou regeneração), é de extrema importância que sejam feitas adaptações dos protocolos para cada cultivar (CIDADE, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de Realização e Material Vegetal

Os experimentos e as atividades realizadas ao longo da presente dissertação foram desenvolvidas no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, pertencente ao Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Foi utilizada como fonte de explante a cultivar RB867515, visando ajustar o protocolo para o genótipo específico e futuras aplicações, em função de sua representatividade no cenário da cultura da cana no Brasil, uma vez que tal cultivar abrange 25% de toda área destinada à cultura no país (PMGCA, 2014), possuindo características agrônômicas suficientes para ser utilizada como genótipo base em programas de melhoramento envolvendo transformação genética.

4.2. Tipos de Explantes e Desinfestação

Para a avaliação de diferentes tipos de explantes na indução da embriogênese foram utilizados três tipos de explantes: brotações, ápices caulinares e meristemas caulinares, e objetivando a introdução destes explantes *in vitro* em condições assépticas, foram avaliados diferentes protocolos de desinfestação.

4.2.1. Brotações de ápice e base originadas do campo

Foram utilizados colmos de cana-de-açúcar, com idade média de 6 a 10 meses, provenientes de campo de duas localidades: Horto do Dep. de Genética da UFRRJ e Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia, situado na BR 465 Km 7 na cidade de Seropédica – RJ.

A fim de avaliar a existência de diferença no potencial de indução de calos em relação à localização das brotações na planta, foram consideradas as cinco gemas mais próximas à ponteira como gemas apicais e o restante como gemas basais, Os colmos foram cortados em segmentos nodais de aproximadamente 6,0 cm e em seguida foram submetidos a uma lavagem com detergente comercial neutro e água corrente para remoção de impurezas sólidas.

Foram então imersos por uma hora em solução de hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo). Em seguida foram acondicionados em bandejas com folhas de papel levemente úmidas para germinação e colocados em BOD sob a temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, por sete dias, para o desenvolvimento das gemas e obtenção das brotações. Após o período de incubação foram selecionadas as brotações mais vigorosas com desenvolvimento em torno de 5,0 cm (Figura 2)



Figura 2: Segmento nodal com gema desenvolvida medindo aproximadamente 5,0 cm. Seropédica 2013

As brotações de base e ápice selecionadas foram novamente lavadas em água corrente com detergente comercial neutro e submetida a diferentes tratamentos para desinfestação:

T1: Desinfestação-base: Consistiu na retirada das folhas mais externas e submersão dos explantes em solução de álcool etílico 70% por 1 minuto seguido de 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo), sob agitação constante.

T2: Desinfestação-base seguida de uma etapa de imersão em solução com água destilada autoclavada e bicloreto de mercúrio a 0,05%, por 15 minutos.

T3: Desinfestação-base seguida de um processo de imersão em solução com o fungicida Cercobin - IHARABRAS (Princípio ativo: tiofanato-metilico) ($0,7 \text{ g.L}^{-1}$) por 10 minutos.

T4: Desinfestação-base seguida de imersão em solução de tiofanato-metilico (Cercobin) ($0,7 \text{ g.L}^{-1}$) por 10 minutos (T3), submetendo os explantes a condições de vácuo, com auxílio de uma seringa, objetivando a penetração da solução fungicida no tecido vegetal.

Após cada processo de desinfestação, foram realizadas lavagens com água destilada autoclavada. Em seguida da realização de cada tratamento de desinfestação, em condições assépticas na câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em solução com hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo) por 20 minutos, seguido de tríplice lavagem em solução estéril de ácido cítrico a 150 mg.L^{-1} . Com auxílio de bisturi e pinça esterilizados, foram retiradas as bainhas e os explantes foram colocados em tubos de ensaio contendo meio para indução de calos MS (Murashige & Skoog, 1962) com suplementação de 30 g.L^{-1} de sacarose, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, 100 mg.L^{-1} de ácido cítrico, 25 mg.L^{-1} de ácido ascórbico, 100 mg.L^{-1} de PVP, solidificado com $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Gelrite, com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg.L^{-1}).

Os tubos foram mantidos no escuro em BOD, sob a temperatura de $25 \text{ }^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias. Após os 30 dias em meio de indução, foi realizada a pesagem dos calos nos diferentes tratamentos, e então transferidos para outro meio de cultura, com as mesmas concentrações, onde permaneceram por mais 30 dias sob as mesmas condições de crescimento. O material referente a esta fase foi avaliado somente quanto à indução de calos.

O experimento foi avaliado por meio de delineamento inteiramente casualizado. A unidade experimental correspondeu a oito tubos de ensaio por tratamento. Os dados foram submetidos à análise da variância e foram realizadas as análises do resíduo para verificação das pressuposições da ANOVA.

4.2.2. Meristemas caulinares originados do campo

Para induzir brotações de plantas de onde foram retirados os meristemas foram utilizados colmos de cana-de-açúcar, com idade média de seis a dez meses, provenientes do canal da Biofábrica Campus Campos dos Goytacazes, RJ.

Os colmos foram cortados em segmentos nodais de aproximadamente 6,0 cm e submetidos a uma lavagem com detergente comercial neutro e água corrente, para remoção de impurezas sólidas.

Em seguida foram acondicionados em bandejas contendo terra e torta de filtro e foram colocados em casa de vegetação, para brotação das gemas (Figura 3). A irrigação foi realizada a cada dois dias, evitando-se encharcar o substrato.



Figura 3: Toletes de cana-de-açúcar da variedade RB867515 antes de serem encobertos pelo substrato e alocados em casa de vegetação. Seropédica, 2013.

Após 20 dias de brotação, as plantas apresentavam cerca de 30 cm, tamanho suficiente para extração dos meristemas caulinares. As plantas foram então removidas através de cortes bem rentes à superfície dos toletes. Em seguida, foram lavadas em água corrente, para retirada de impurezas superficiais, e então submetidas a dois tratamentos para desinfestação:

T1: Desinfestação-base: Consistiu na retirada das folhas mais externas e submersão dos explantes em solução de álcool etílico 70% por 1 minuto seguido de 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo), sob agitação constante.

T2: Desinfestação-base, acrescentando-se um processo de imersão em solução com tiofanato-metilico (Cercobin) ($0,7 \text{ g.L}^{-1}$) por 10 minutos.

Após cada processo de desinfestação, foram realizadas lavagens com água destilada autoclavada. Em seguida da realização de cada tratamento de desinfestação, em condições assépticas na câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em solução com hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo) por 20 minutos, seguido de tríplice lavagem em solução estéril de ácido cítrico a 150 mg.L^{-1} . Com auxílio de bisturi e pinça esterilizados, foram retiradas as bainhas e os explantes foram então colocados em meio para indução de calos.

Após o processo de desinfestação, os meristemas foram segmentados a 1 cm da parte mais basal do explante e incubados em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado de 30 g.L^{-1} de sacarose, 2 mg.L^{-1} de 2,4-D, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, 100 mg.L^{-1} de ácido cítrico, 25 mg.L^{-1} de ácido ascórbico, 100 mg.L^{-1} de PVP, solidificado com $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Gelrite. Os tubos foram incubados em BOD, no escuro, sob a temperatura de $25 \text{ }^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias.

Os protocolos de desinfestação foram avaliados quanto à eficiência de descontaminação, assim como o impacto dos processos sobre a indução de calos nos explantes. As análises estatísticas foram feitas através do teste de Qui-Quadrado.

4.2.3. Ápice Caulinar (Plantas estabelecidas *in vitro*)

Foram utilizados como explantes ápices caulinares de plantas já estabelecidas *in vitro*. As plantas micropropagadas foram originadas da Biofábrica do Campus Campos dos Goytacazes, UFRRJ.

Após a coleta das plantas e o processo de desinfestação (T1) anteriormente descrito, os explantes foram segmentados em fragmentos medindo em torno de 1,0 cm e inoculados em tubos de ensaio, individualmente. O meio de cultura utilizado consistiu no meio MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado 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, 0,15 mg.L⁻¹ de cinetina, e 0,30 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP).

Os explantes foram incubados em sala climatizada, sob a temperatura de 25° ± 2°C com fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de ± 30 μmol m⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram, luz do dia, 40 W).

Após 30 dias, os explantes foram transferidos para potes contendo o mesmo meio citado anteriormente. As condições de incubação também foram as mesmas já descritas. Foram realizados subcultivos a cada 30 dias até a obtenção da quantidade de material suficiente para realização dos experimentos de embriogênese somática utilizando o ápice caulinar dessas plantas.

4.3. Indução da Embriogênese Somática

Os ápices caulinares, originados das plantas micropropagadas, foram cortados a 1,0 cm da parte mais basal e foram acondicionados em placas de Petri contendo meio MS com a mesma constituição básica descrita no item 4.2.2. Em cada placa de Petri foram inoculados seis explantes (Figura 4)

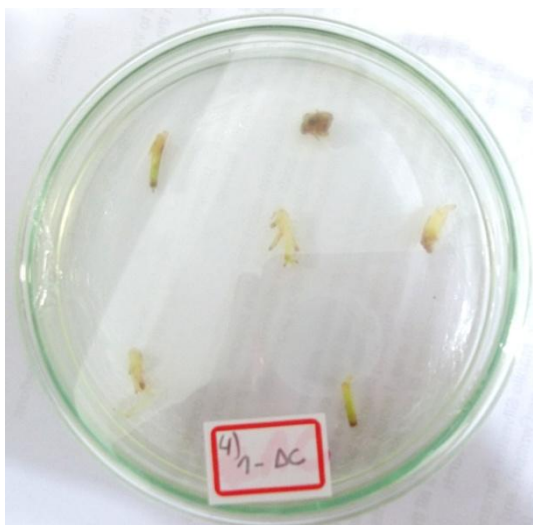


Figura 4: Placa contendo ápices caulinares em meio para indução de calos. Seropédica, 2014

A fim de avaliar a melhor composição do meio de cultura para indução de calos, a partir desse tipo de explante, foram analisadas as concentrações de 2,4-D: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg.L⁻¹ e ,também, a suplementação ou não com 50 ml.L⁻¹ de água de coco.

As placas foram incubadas em BOD, no escuro, sob a temperatura de 25° ± 2°C por 30 dias. Ao fim dos 30 dias de incubação, foi realizada a repicagem dos calos para um meio de cultura novo, com as mesmas constituições, onde permaneceram por mais 30 dias.

Para acompanhamento do crescimento dos calos foram realizadas medições semanais do tamanho, com auxílio do paquímetro, além da avaliação da indução de calo e embriogênese somática com o uso de uma escala de notas de 0 a 5, desenvolvida com este objetivo, conforme a tabela 1.

Tabela 1: Escala de notas desenvolvidas para acompanhamento da indução de calos de cana-de-açúcar.

Notas	Porcentagem de indução
0	Tecido vegetal sem indução
1	Menos de 25% do tecido ocupada por massa de calo
2	Entre 25 e 50% do tecido ocupada por massa de calo
3	Entre 50 e 75% do tecido ocupada por massa de calo
4	Mais de 75 % do tecido ocupada por massa de calo
5	Mais de 75% do tecido ocupada por massa de calo, com áreas embriogênicas

O delineamento utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC). A unidade experimental foi constituída por quatro placas de Petri (contendo seis explantes) por tratamento e as análises estatísticas foram feitas através da média destas placas.

As análises estatísticas dos parâmetros avaliados foram submetidas à análise de variância e foram realizadas as análises do resíduo para verificação das pressuposições da ANOVA. Para dose, os efeitos foram ajustados ao modelo de regressão. Os dados das notas relativas ao desenvolvimento dos calos foram transformados em $\sqrt{(x + 0,5)}$, os demais dados não foram transformados. A comparação de médias das doses foi realizada por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.4. Multiplicação das Culturas Embriogênicas

Esta etapa teve como objetivo avaliar a eficiência do ácido indol-3-acético (AIA) no desenvolvimento de áreas embriogênicas dos calos de cana-de-açúcar. Para analisar esta multiplicação das culturas embriogênicas, os calos foram transferidos para meio MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, 25 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 100 mg.L⁻¹ de PVP, solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Gelrite.

Os tratamentos realizados foram a suplementação ou não do meio de cultura com 4 mg.L⁻¹ de AIA. Os calos foram cultivados em placas de Petri e incubados em BOD, no escuro, à 25° ± 2°C por 30 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o DIC em que foi considerado como unidade experimental quatro placas de Petri contendo seis calos/placa.

Foram realizadas medições semanais do crescimento da área embriogênica dos calos em cada tratamento, além da avaliação da qualidade e porcentagem do tecido vegetal ocupado por massa embriogênica com o uso de uma escala de notas (de 0 a 4) desenvolvida para este objetivo (Tabela 2).

Tabela 2: Escala de notas desenvolvidas para acompanhamento do desenvolvimento da área embriogênica em calos de cana-de-açúcar.

Notas	Porcentagem de massa embriogênica
0	Tecido vegetal sem áreas embriogênicas
1	Menos de 25% do tecido ocupada por massa embriogênica de calo
2	Entre 25 e 50% do tecido ocupada por massa embriogênica de calo
3	Entre 50 e 75% do tecido ocupada por massa embriogênica de calo
4	Mais de 75 % do tecido ocupada por massa embriogênica de calo

Os dados obtidos foram analisados através de parcela subdividida, de forma que foi considerado o tratamento de origem dos calos (doses de 2,4D e suplementação ou não de água de coco no meio de indução) (subparcela) e o seu desenvolvimento no novo meio de cultura (com e sem suplementação de AIA) (parcela). Este desdobramento foi realizado com o objetivo de verificar se a interação entre os tratamentos é significativa. Todos os parâmetros foram submetidos à análise de variância. Os dados das notas relativas ao desenvolvimento dos calos foram transformados em $\sqrt{(x + 0,5)}$, os demais dados, não foram transformados.

4.4. Regeneração de Plantas

A fim de avaliar a obtenção de plantas através da cultura de calos, foram testados dois meios de regeneração: Meio MS basal sem reguladores de crescimento e o Meio MS basal suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃. Os calos foram cultivados em placas de Petri e incubados em BOD, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com irradiância de 30 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida com lâmpadas de 40W Osram, à 25° ± 2°C por 60 dias.

Após 30 dias de incubação, as plântulas regeneradas a partir de embriões somáticos, foram transferidos para frascos com tampa de polipropileno, contendo o mesmo meio de cultivo, para melhor desenvolvimento.

Foram realizadas repicagens para novo meio de cultura, a cada 15 dias em função da grande liberação de compostos fenólicos e para melhor desenvolvimento das plantas.

Foram considerados eventos de regeneração completos os calos com pelo menos uma planta de no mínimo 2,0 cm de comprimento. A porcentagem de calos regenerados em plantas foi quantificada ao fim de 30 dias de incubação

Foi utilizado como delineamento experimental o delineamento inteiramente casualizado (DIC) composto por dez repetições (placas) por tratamento. Cada placa foi constituída por seis calos.

4.5. Enraizamento

Tendo como objetivo a melhor composição para o enraizamento das plantas regeneradas e avaliar a eficiência do carvão ativo, nesta etapa, foram testados dois tipos de meio: Meio MS basal acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA com e sem a suplementação de carvão ativo (0,03%) (p/v).

As plantas foram incubadas em tubos de ensaio (Figura 5) em BOD, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e oito horas de escuro, com irradiância de 30 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida com lâmpadas de 40W Osram, à 25° ± 2°C por 30 dias.

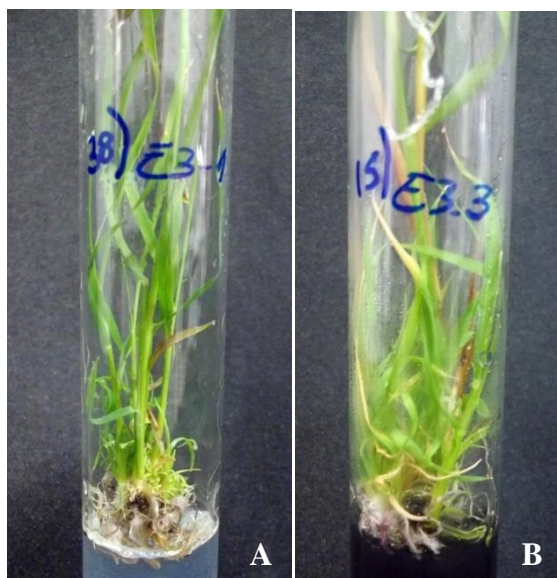


Figura 5: Plantas regeneradas em meio de enraizamento. A) Meio suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. B) Meio suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $0,03\%$ de carvão ativo. Seropédica, 2014

Após esse período foi realizada a medição de raízes considerando como unidade experimental 20 tubos de ensaio por tratamento. Destes foi realizada aleatoriamente a quantificação de raízes de três tubos por tratamento através do Scanner WinRHIZO. Os dados de medição foram analisados através do teste de Qui-quadrado.

Para aclimação, as plantas foram transferidas para copos contendo areia e vermiculita (1:1) autoclavados. As plantas foram mantidas em fitotrón sob fotoperíodo de 16 horas de luz e oito horas de escuro, com irradiância de $250 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 dias.

As plantas foram cobertas com copos furados até o sétimo dia, a fim de minimizar o impacto da diferença de ambiente de cultivo (Figura 6). Após sete dias de aclimatização, a cobertura foi retirada e as plantas receberam uma solução composta por $\frac{1}{4}$ dos sais do meio MS.



Figura 6: Planta regenerada em recipiente coberto, visando melhor aclimação. Seropédica, 2014

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Desinfestação

De acordo com o Teste de Qui-quadrado, os tratamentos de desinfestação analisados diferiram estatisticamente. No presente trabalho, observou-se a eficiência do uso do hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes. Sua utilização tem sido frequente na desinfestação de explantes de cana-de-açúcar (LAKSHMANAN et al, 2006; KHAN et al., 2007; BARBOSA, 2010; MACEDO, 2010; TIWARI et al., 2012).

Nas tabelas a seguir são mostradas as porcentagens de contaminação e indução de calos ocorrentes, após cada protocolo de desinfestação, nos dois tipos de explantes avaliados.

Tabela 3: Efeito dos tratamentos de desinfestação na porcentagem de contaminação e indução de calos oriundos de brotações de cana-de-açúcar

Protocolo de Desinfestação Utilizado	% de Contaminação por fungos e/ou bactérias	% de Indução dos explantes
T1: Desinfestação-base: submersão dos explantes em solução de álcool 70% (1 minuto), seguido de 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio	52	90
T2: Desinfestação-base com uma etapa de imersão em solução estéril de bicloreto de mercúrio a 0,05%, por 15 minutos	100	0
T3: Desinfestação-base acrescentando-se um processo de imersão em solução com o fungicida Cercobin (0,7 g.L ⁻¹) por 10 minutos	80	20
T4: Desinfestação-base com imersão em solução com o fungicida Cercobin (0,7 g.L ⁻¹) por 10 minutos (T3), submetendo os explantes a condições de vácuo	50	0

Tabela 4: Efeito dos tratamentos de desinfestação na porcentagem de contaminação e indução de calos oriundos de meristemas caulinares de cana-de-açúcar

Protocolo de Desinfestação Utilizado	% de Contaminação por fungos e/ou bactérias	% de Indução dos explantes
T1: Desinfestação-base: submersão dos explantes em solução de álcool 70% (1 minuto), seguido de 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio	40	95
T2: Desinfestação-base, acrescentando-se um processo de imersão em solução com o fungicida Cercobin (0,7 g.L ⁻¹) por 10 minutos	17	0

Khan et al. (2007) ao estudar a eficiência da desinfestação de várias concentrações e tempos de exposição ao hipoclorito de sódio sobre explantes de cana-de-açúcar, determinou como mais indicada a concentração de 50% de água sanitária comercial (concentração final de 1,25% de cloro ativo) por 20 minutos, assim como adotado neste trabalho. Ainda no mesmo trabalho, ao utilizar água sanitária em concentração e tempos de exposição maiores, foi observada a redução de 90% na viabilidade dos explantes (concentração de 100% por 30 minutos), além da alta ocorrência de necrose no tecido dos explantes.

O tratamento com hipoclorito de sódio contribui para este escurecimento do tecido em função do seu alto poder oxidante. O que ocorre é a oxidação de compostos fenólicos que são liberados pelas células danificadas com o corte. As extremidades tornam-se escuras rapidamente. Os produtos da oxidação são tóxicos ao resto do explante e se difundem no meio de cultura, escurecendo-o (RODRIGUES, 2003).

Conforme o mostrado na tabela 3, o tratamento envolvendo a etapa de desinfestação com bicloreto de mercúrio (0,05%) (T2) não foi eficiente na eliminação de microrganismos. Resultados diferentes foram encontrados por Tiwari et al. (2012) ao avaliar quatro concentrações do composto, determinando como eficiente na desinfestação e sem letalidade ao explante, a menor concentração – 0.1%.

Melo et al. (2009) encontraram resultados satisfatórios utilizando concentração inferior de bicloreto de mercúrio (0,05%). A contaminação foi ocorrente em 43,48% dos explantes ao utilizar o bicloreto de mercúrio e em 70%, quando o tratamento não era empregado.

Uma hipótese para a divergência de resultados é o estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz ao serem coletados os explantes, uma vez que tais condições tem grande influência no comportamento *in vitro* (JIMÉNEZ, 2001).

A imersão dos explantes em solução de tiofanato-metílico (Cercobin) (0,7 g.L⁻¹) por 10 minutos, como etapa adicional à desinfestação-base, obteve baixa eficiência de desinfestação (20%) e influenciou negativamente (80%) a indução dos explantes. Resultados semelhantes foram encontrados por Cruz et al., (2013), em que todas as concentrações avaliadas para o fungicida Cercobin, foram ineficazes.

Nos estudos de Melo et al. (2009), o tratamento envolvendo Cercobin (tiofanato-metílico) (1,4 g.L⁻¹) teve resultados inferiores quando comparado ao uso de Agrimicina (4,0 g.L⁻¹) – 71,83% e 39,70% de contaminação, respectivamente. Porém, não foi relatada a interferência na indução dos explantes, como no presente estudo.

Apesar de a imersão dos explantes em solução de Cercobin (tiofanato-metílico) ($0,7 \text{ g.L}^{-1}$) por 10 minutos, sob condições de vácuo, (tabela 3) ter resultado na menor porcentagem de contaminação, quando comparado aos outros tratamentos para este mesmo explante, não foi verificada a indução de calos dos mesmos.

De acordo com Pasqual (2001), o uso de vácuo à solução aumenta a dilatação dos poros do propágulo, facilitando a penetração da solução desinfestante. Entretanto, a média de sobrevivência do material inoculado ainda é baixa, quando submetidos às essas condições (HANDA et al., 2005).

Conforme os dados da tabela 4, apesar da utilização de tiofanato-metílico (T2) ter resultado em menor incidência de contaminação (17%), houve um comprometimento da indução dos explantes. Assim como nos estudos de León (2010), em que a utilização do fungicida Cercobin ocasionou efeito fitotóxico comprometendo a germinação *in vitro* de *Luehea divaricata*.

O fungicida Cercobin, cujo princípio ativo é o tiofanato-metílico, pertencente ao grupo dos benzimidazóis. Este grupo possui efeito sobre um amplo espectro de fungos, justificando assim sua utilização no presente trabalho.

De forma geral, os meristemas caulinares e as brotações constituíram boas fontes de explantes. Porém em função da maior disponibilidade e menor tempo de obtenção, as brotações foram consideradas mais promissoras.

5.2. Indução da Embriogênese Somática

5.2.1. Brotações de ápice e base

A iniciação da formação de calos ocorreu cinco dias após a introdução dos explantes no meio. Conforme as análises dos dados pela ANOVA, não houve diferença significativa no potencial de indução de calos entre brotações de ápice e de base.

Com relação às doses de 2,4-D analisadas, também não foram encontradas diferenças significativas (Figura 7), indicando que a utilização de 1 mg.L^{-1} já seria suficiente para a produção de calos quando comparadas ao obtido com as outras concentrações avaliadas.

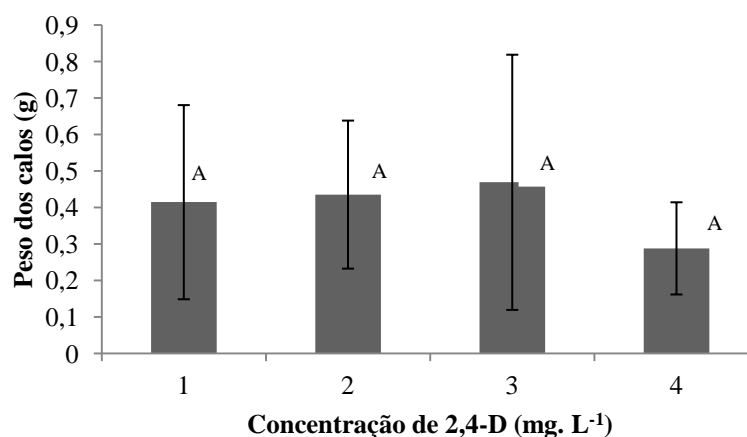


Figura 7: Peso dos calos em função de diferentes concentrações de 2,4-D. As barras verticais representam o desvio padrão. Médias seguidas de letras idênticas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Ramos (2011) ao utilizar a concentração de $1,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D para o mesmo tipo de explante e cultivar encontrou a menor porcentagem de calogênese quando comparadas às outras concentrações testadas. Supõe-se que a divergência de resultados seja em função do modo que as brotações foram obtidas, uma vez que neste trabalho as brotações foram induzidas na presença de luz (TAIZ e ZEIGER, 2004). Hipoteticamente, as brotações obtidas no presente estudo não sofreram degradação da auxina endógena, já que foram induzidas no escuro, refletindo na indução dos calos.

O fato das brotações terem sido obtidas de duas localidades diferentes, não tendo portanto uniformidade de cultivo como: fertilidade do solo, irrigação, luz, abre uma grande possibilidade de influência sobre os resultados obtidos, uma vez que as condições de crescimento das plantas, que têm grande influência no nível endógeno de hormônios, sobretudo de auxinas, não eram as mesmas. A falta de uniformidade desses parâmetros pode ter influenciado no desenvolvimento *in vitro*.

5.2.2. Ápices Caulinares

A iniciação da formação de calos ocorreu no quinto dia após a inoculação dos explantes. Observou-se que neste período, os explantes se apresentavam intumescidos iniciando a formação de calos nas extremidades, onde houve a secção.

De acordo com ANOVA geral, os dados obtidos da área dos calos e do sistema de notas foram altamente significativos ao nível de 1% de probabilidade. Considerando a significância dos resultados e o comportamento compatível com a análise de área dos calos (Figuras 8 e 9), o sistema de notas demonstrou ser um bom parâmetro adicional para avaliar a embriogênese somática em cana-de-açúcar. Os dados submetidos à análise de variância apresentaram interação altamente significativa (ao nível de 1%) entre as doses de 2,4 D avaliadas e o uso de água de coco no meio de indução. Portanto foi realizado o desdobramento da interação. Com relação às doses, também houve diferença significativa, sendo estas ajustadas ao modelo de regressão.

A análise do desdobramento da interação AC x Dose, obteve significância ao nível de 1% de probabilidade, para as duas vertentes: AC1 x Dose (meio com água de coco) e AC0 x Dose (meio sem água de coco). Como o demonstrado pela figura 8, tem-se que ambas as interações podem ser explicadas por funções quadráticas.

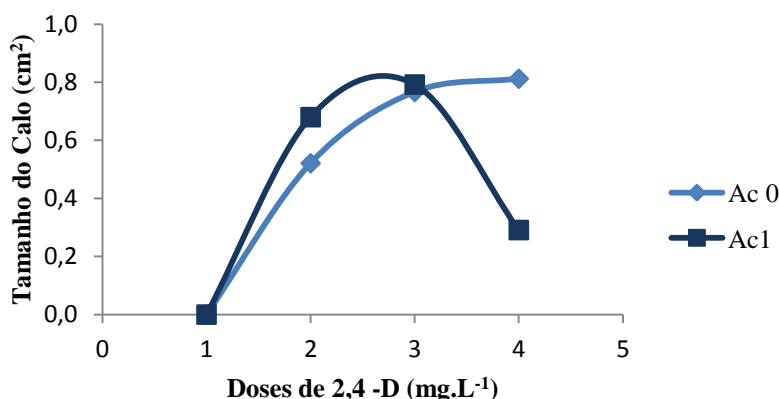


Figura 8: Tamanho (cm²) dos calos formados em meio contendo água de coco (Ac1) e sem água de coco (Ac0) em diferentes concentrações de 2,4-D (Ac1: $y = -0,2953x^2 + 1,5753x - 1,2822/R^2 = 0,9997$; Ac 0: $y = -0,1189x^2 + 0,8625x - 0,7399/R^2 = 0,9993$)

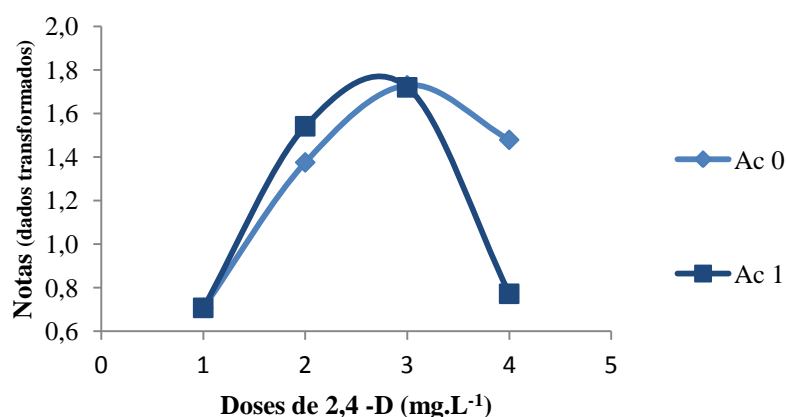


Figura 9: Figura - Avaliação da calogênese em meio contendo água de coco (Ac1) e sem água de coco (Ac0) em diferentes concentrações de 2,4-D. (Ac1: $y = -0,4453x^2 + 2,2638x - 1,135/R^2 = 0,9863$; Ac 0: $y = -0,2295x^2 + 1,4145x - 0,4924/R^2 = 0,9926$). Transformação de dados $\sqrt{(x + 0,5)}$

Os altos valores de R^2 nos permitiram prever, por meio das equações de cada interação, as doses ideais do hormônio 2,4-D. Desta forma, para meios de indução de calos com água de coco, tem-se a concentração ideal, $2,667 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, e para meios de indução de calos sem água de coco tem-se $3,627 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D.

O uso da água de coco em meios de cultivo apresenta controvérsias, devido sua composição não ser padronizada e mensurada. Picelli (2010) ao avaliar a diferença de indução de calos de cana-de-açúcar em meio suplementado ou não com água de coco, encontrou diferenças significativas quanto ao número de calos morfogênicos formados. Nesse estudo, foi verificado que o meio com água de coco e 3 mg.L^{-1} de 2,4-D, mostrou-se melhor na indução de calos, sugerindo que esta suplementação propiciou um melhor balanço entre auxinas e citocininas para a proliferação celular e formação de calos embriogênicos.

Esta composição do meio (suplementação de água de coco e 3 mg.L^{-1} de 2,4-D) também mostrou bons resultados para indução de calos com características morfogênicas em outras variedades de cana-de-açúcar (FALCO et al., 2000; MELLOTO-PASSARIN, 2009).

Como o demonstrado pela predição da equação de interação AC x Dose, supõe-se que para melhores resultados na indução de calos na cultivar em estudo, a água de coco deve ser usada em combinação com uma concentração de 2,4-D intermediária ao que foi testado aqui ($\cong 2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D).

Conforme a análise das doses de 2,4-D, nas condições do presente trabalho, a concentração de 3 mg.L^{-1} foi a que apresentou maiores taxas de indução e, por isso, foi selecionada para dar continuidade ao processo de multiplicação de calos (Tabela 5).

Tabela 5: Média da área de calos em diferentes doses de 2,4-D (mg.L⁻¹)

Dose	Médias
3	0,7796 A
2	0,6006 B
4	0,5518 B
1	0,0000 C

Médias seguidas de letras idênticas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Como nos estudos de Lakshmanan (2006), foram encontrados três tipos morfológicos de calos com diferentes potenciais morfogênicos: 1) Calos com aspecto duro, compacto e com alta capacidade embriogênica (Figura 10A), 2) macio, friável, translúcido, mas não embriogênico (Figura 10B), 3) macio, mucilaginoso, brilhante e não embriogênico (Figura 10C). Além do tipo intermediário com tecido não embriogênico coberto com porções embriogênicas (Figura 10 D)

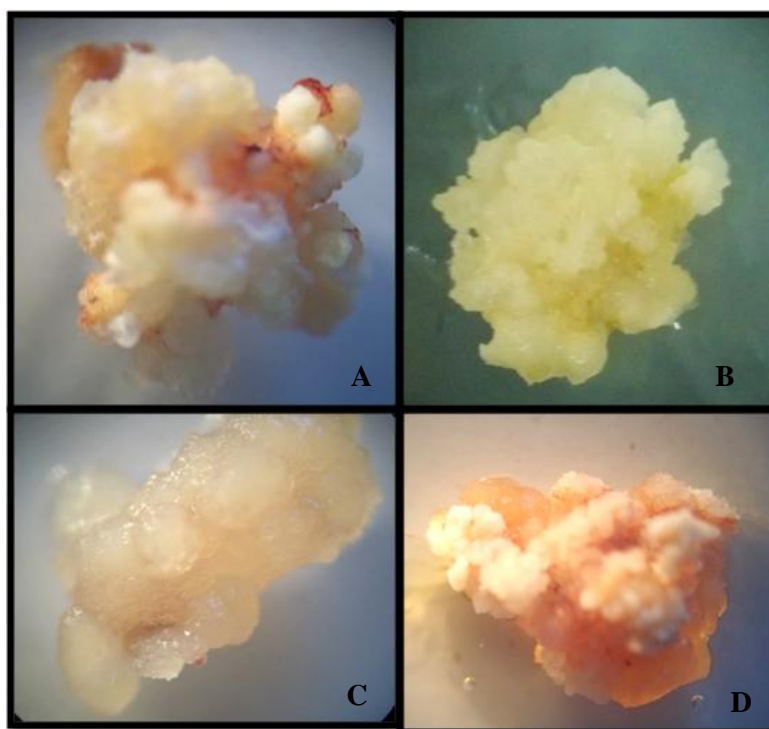


Figura 10: Diferentes tipos de calos. A) Calo embriogênico com aspecto duro e compacto, B) Calo não embriogênico macio, friável e translúcido, C) Calo não embriogênico macio, mucilaginoso e brilhante, D) Calo misto com tecido não embriogênico coberto com porções embriogênicas. Seropédica, 2014.

Ramos (2011) ao avaliar diferentes tipos e concentrações de auxinas para a mesma cultivar desse estudo, observou que os explantes mantidos nos tratamentos com 4,4 mg.L⁻¹ de 2,4- D formavam maior quantidade de calos em relação aos outros tratamentos.

No estudo de Bortoleto (2010), também com a cultivar RB867515, foi obtida maior indução de calos embriogênicos em meio com 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D, corroborando os dados obtidos nesse trabalho.

O 2,4-D tem sido a principal auxina utilizada na embriogênese somática em cana-de-açúcar (HEEDERT, 2008; GALLO-MEAGHER et al., 2000; SILVA, 2010; BARBOSA, 2010; JESUS, 2010; MUDRY, 2011). Conforme Vasil (1983), a maior eficiência de indução de calos em cana-de-açúcar em função do uso do 2,4-D como auxina, se deve à rápida metabolização deste, levando ao espessamento das paredes celulares e a diferenciação irreversível em embriões somáticos.

A divergência de resultados quanto à concentração ideal de 2,4-D pode ser explicada conforme Lakshmanan (2006) e Cidade et al. (2006), em que a indução de calos tem resposta genótipo dependente. Sendo assim, torna-se necessária a avaliação da composição e concentrações ideais do meio de indução de calos para cada cultivar.

De acordo com as análises da ANOVA houve interação altamente significativa (ao nível de 1%) entre as avaliações e as doses (Av x Dose) utilizadas. A fim de demonstrar o comportamento das doses dentro das avaliações, foi feito então o desdobramento da interação. O resultado da análise do desdobramento da interação Av x Dose, obteve significância ao nível de 5% de probabilidade, exceto para a vertente de comportamento das doses dentro da última avaliação (56 dias). Esta vertente obteve resultado não significativo.

Como o demonstrado pela figura 8, as concentrações de 1 e 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D corresponderam às dosagens menos indicadas à produção de calos para a cultivar em questão. Em função de essas dosagens serem letais, ao longo das avaliações foram sendo descartadas as placas com explantes mortos, influenciando assim na significância da última avaliação.

Conforme a figura 8 e 9, as interações podem ser explicadas por funções quadráticas.

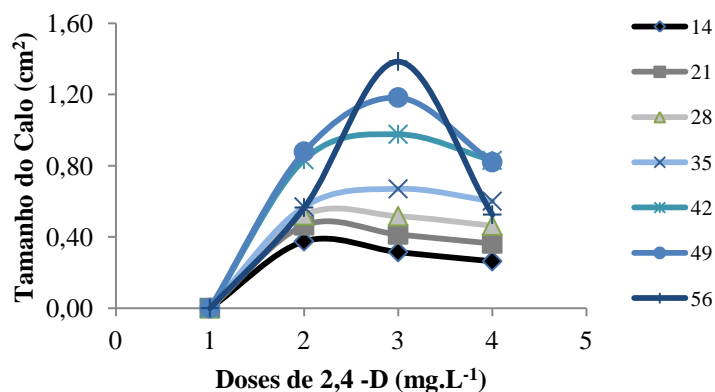


Figura 11: Tamanho (cm²) dos calos formados de acordo com diferentes concentrações de 2,4-D ao longo de 56 dias de avaliação.

Dose/Av 14 dias : $y = -0,1066x^2 + 0,6058x - 0,477$ / R^2 0,8794;

Dose/Av 21 dias: $y = -0,1289x^2 + 0,7481x - 0,5934$ / R^2 : 0,9005;

Dose/Av 28 dias: $y = -0,1434x^2 + 0,8556x - 0,6882$ / R^2 : 0,9397;

Dose/Av 35 dias: $y = -0,1595x^2 + 0,9878x - 0,8134$ / R^2 : 0,9846;

Dose/Av 42 dias: $y = -0,2448x^2 + 1,4873x - 1,2224$ / R^2 : 0,9865;

Dose/Av 49 dias: $y = -0,3103x^2 + 1,8276x - 1,522$ / R^2 :0,9994;

Dose/Av 56 dias: $y = -0,3561x^2 + 2,0203x - 1,7609$ / R^2 : 0,8091.

De acordo com o crescimento dos explantes em 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D ao longo das avaliações, nota-se pela figura 11 que o tempo de exposição à esta dosagem da auxina, começou a ser prejudicial ao seu desenvolvimento a partir de 42 dias, onde iniciou-se a estagnação do crescimento e por fim, morte na maioria dos explantes. Melo (2011) ao inocular explantes de cana-de-açúcar em meio acrescido de 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D verificou um

decréscimo significativo na indução e crescimento dos calos formados, corroborando os resultados aqui obtidos.

Já nos resultados obtidos por Ramos (2011), explantes oriundos de brotações de RB867515 tiveram maior indução de calos embriogênicos em meio com 4,4 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Supõe-se que a divergência de resultados seja em função da fonte de explante inicial e da quantidade de auxinas endógenas no explante (JIMÉNEZ, 2001).

5.3. Multiplicação das Culturas Embriogênicas

A multiplicação de culturas embriogênicas é uma etapa de grande valia em função da propagação de material apto à regeneração. Nesta fase foram utilizados calos originados de três diferentes meios de indução (T1: 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D com suplementação de água de coco, T2: 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D sem suplementação de água de coco e, T3: 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D sem suplementação de água de coco).

Foram empregadas as concentrações de 2,4-D e o tipo de meio (3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, sem suplementação de água de coco) que apresentaram os melhores resultados na indução de calos.

As avaliações da multiplicação da área embriogênica (medição) e pelo sistema de notas (tabela 2) foram significativos ao nível de 5% de probabilidade. Conforme a ANOVA, o efeito da suplementação do meio de multiplicação com AIA não foi significativo, assim como sua interação com os tratamentos de indução. Este resultado indica que a adição de AIA visando aumentar a produção de área embriogênica, foi ineficaz para a cultivar em questão.

De acordo com os estudos de Fisher et al. (1996) e Kong et al. (1997), o AIA influencia nos processos de diferenciação e no estabelecimento da simetria bilateral dos embriões. Dudits et al. (1995) sugere a multiplicação dos calos embriogênicos pode ser favorecida por um aumento nos níveis endógenos do AIA.

Para a cultivar RB867515, nas condições deste estudo, a suplementação do meio com AIA não beneficiou a multiplicação das áreas embriogênicas. Ramos (2011) ao estudar a influência de diferentes concentrações de AIA na multiplicação de culturas embriogênicas de cana-de-açúcar, também não observou efeito significativo, corroborando os dados encontrados neste trabalho.

Outros estudos obtiveram a multiplicação das áreas embriogênicas por meio de sucessivos subcultivos dos calos (PASTERNAK et al., 2002; MELLOTO-PASSARIN, 2009). Entretanto, a manutenção prolongada dos embriões *in vitro* e repetidos subcultivos, podem acarretar instabilidade genética e aumentar chance de ocorrer variação somaclonal (LAKSHMANAN et al., 2006).

Suprasanna et al. (2005) citaram como um dos principais objetivos em relação à embriogênese somática a necessidade de desenvolver um método reprodutível para propagação rápida de plantas. Essa rápida regeneração constitui uma estratégia para diminuir significativamente o período total *in vitro*, assim como a permanência das culturas no estágio de calos, a fim de minimizar a variação somaclonal, efeito que não é interessante para a propagação comercial e transformação genética em cana-de-açúcar (LAKSHMANAN et al., 2006).

As análises realizadas pela ANOVA mostraram interação significativa a 5% de probabilidade para o tipo de tratamento utilizado na indução dos calos (doses de 2,4-D com ou sem a suplementação de água de coco) e as avaliações na multiplicação das culturas embriogênicas (T x AV). Portanto foi realizado o desdobramento da interação. A análise do desdobramento da interação mostrou efeito significativo para o comportamento das avaliações no tratamento de indução 1 (T1: 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D com água de coco) e 2 (T2: 3,0 mg.L⁻¹ de

2,4-D). O desenvolvimento da área embriogênica dos calos provenientes destes meios pode ser explicado por função linear (Figura 12).

De acordo com a análise do gráfico, os calos originados de meio de indução com 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e água de coco apresentaram maior desenvolvimento de área embriogênica quando comparados aos demais. Isso sugere que apesar dos calos utilizados serem morfológicamente parecidos, a composição hormonal endógena, sobretudo o balanço hormonal entre auxina e citocinina deixadas como resíduos nos calos tenha potencializado este desenvolvimento.

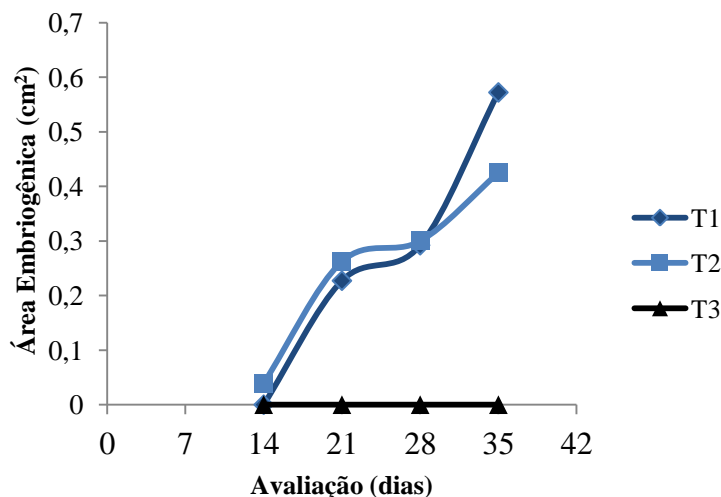


Figura 12: Desenvolvimento da área embriogênica (cm²) dos calos originados de três diferentes meios de indução ao longo das avaliações (T1: 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D com suplementação de água de coco/R²: 0,9531; T2: 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D sem suplementação de água de coco/R²: 0,9209; T3: 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D sem suplementação de água de coco)

Os calos cultivados em meio de indução com 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D sem suplementação de água de coco (T3), que sobreviveram até o fim do período de indução, também foram transferidos para o meio de multiplicação. Porém, a estagnação do crescimento ocorrente desde o 40º dia em meio de indução, continuou sendo observada, portanto não foi avaliado o desenvolvimento de área embriogênica (Figura 13).



Figura 13: Calos com crescimento estagnado, originados de meio indução com $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D sem suplementação de água de coco, em fase de multiplicação. Seropédica, 2014

5.4. Regeneração de Plantas

Os calos obtidos da etapa de multiplicação foram transferidos para meio de regeneração, onde permaneceram por 60 dias até a regeneração em plantas. Nesta etapa foram testados o meio MS basal sem adição de reguladores de crescimento, e o meio MS suplementado com 1 mg.L^{-1} de BAP e 1 mg.L^{-1} de GA_3 . O início da regeneração foi observado após sete dias de transferência para esta fase (Figura 14).

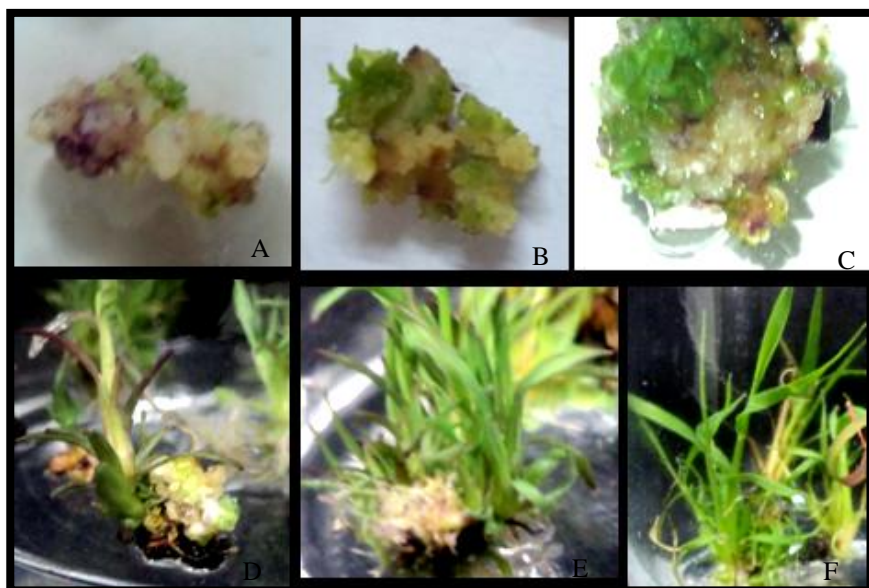


Figura 14: Regeneração de calos em plantas ao longo do período de avaliação. A) 7 dias; B) 14 dias; C) 21 dias; D) 28 dias; E) 35 dias; F) 60 dias. Seropédica, 2014

Também neste período foi observada produção de pigmentos cianicos, provavelmente antocianina, caracterizados pelo aspecto roxo de células superficiais em alguns calos (Figura 15). Macedo (2010) e Silva (2012) ao trabalharem com a embriogênese somática indireta de cana, também observaram grande produção desses pigmentos, além de alto grau de oxidação,

sobretudo em calos não embriogênicos. De acordo com Haq et al. (2005) a produção de antocianina pode ser influenciada por diferentes fatores, sobretudo: luz ultra-violeta (UV), luz, fonte de hidrogênio, estresse osmótico e temperatura.



Figura 15: Calos apresentando pigmentos de antocianina. Seropédica, 2014

O meio de regeneração desprovido de reguladores de crescimento promoveu uma maior regeneração de plantas. A utilização destes reguladores influenciou significativamente (ao nível de 1% de probabilidade) a regeneração dos calos, promovendo uma redução de 25% em comparação ao percentual obtido no meio sem essa suplementação (Tabela 6).

Tabela 6: Percentual de regeneração dos calos em meio de regeneração de acordo com os tipos de meio utilizados (MS basal e MS+ 1 mg.L⁻¹ BAP e 1 mg.L⁻¹ GA₃)

Meio de Regeneração	% de Calos Regenerados
MS basal	75
MS+ BAP+ GA ₃	50

Normalmente, a regeneração de cana-de-açúcar ocorre em meio desprovido de reguladores de crescimento, porém tem sido mostrada uma potencialização deste processo através da adição de diferentes reguladores de crescimento (CHENGALRAYAN e GALLO-MEAGHER 2001; ALI et al. 2008; PICELLI, 2010; WAMAITHA et al. 2010).

Para a cultivar em questão e nas condições deste experimento, a suplementação do meio de regeneração com BAP e GA₃ não beneficiou o processo, além de serem observadas alterações na parte aérea das plantas, tornando-as enroladas e frágeis (Figura 16A).

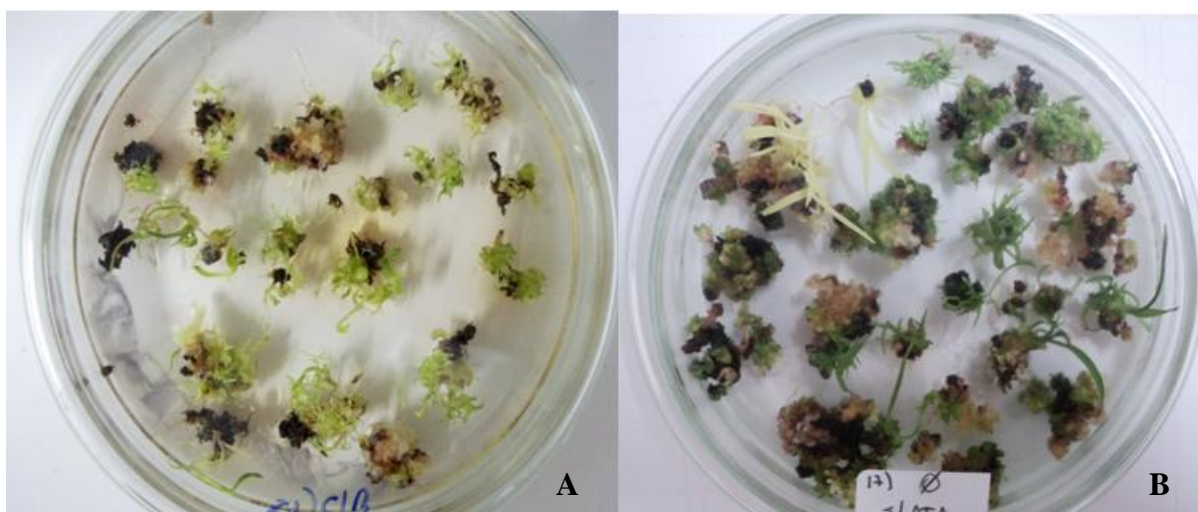


Figura 16: Plantas regeneradas após 30 dias em meio de regeneração. A) Plantas com alteração da parte aérea, regeneradas em meio com suplementação de 1 mg.L^{-1} de BAP e 1 mg.L^{-1} de GA_3 . B) Plantas regeneradas em meio sem reguladores de crescimento sem alterações morfológicas. Seropédica, 2014

Ramos (2011) ao utilizar essas suplementações no meio para regeneração obteve bons percentuais de plantas regeneradas e não relatou a alteração da morfologia da parte aérea. Estudos em outras culturas fazendo uso desta mesma suplementação para regeneração também não relataram alterações fenotípicas das plantas (SILVA, 2002; GUIDOLIN, 2003).

Após os primeiros 30 dias, as plantas já regeneradas foram transferidas para potes com tampas de polipropileno, a fim de proporcionar melhor desenvolvimento e em função da grande ocorrência de oxidação, foram realizadas duas repicagens para um meio novo com a mesma composição, a cada 15 dias (Figura 17).

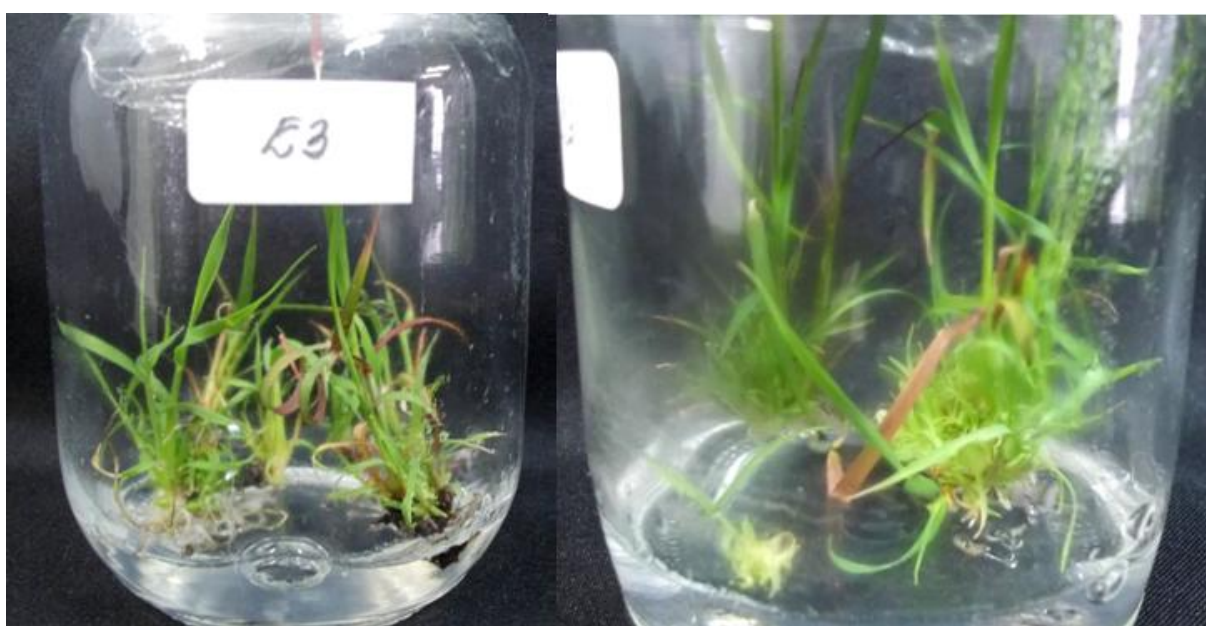


Figura 17: Plantas regeneradas após 60 dias de permanência em meio de regeneração sem reguladores de crescimento. Seropédica, 2014

5.5. Enraizamento

A fim de encontrar a melhor composição do meio para o enraizamento e testar o benefício da sua suplementação com carvão ativado foram avaliados dois meios nesta etapa: Meio MS basal acrescido de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA com (T1) e sem a suplementação de carvão ativado (T2) (0,03%).

De acordo com o teste de Qui-quadrado, os dados avaliados foram altamente significativos ao nível de 1% de probabilidade. O meio para enraizamento que recebeu a suplementação de carvão ativado mostrou maior potencial na formação de raízes (Figura 18).

A avaliação complementar do crescimento radicular através do Scanner WinRHIZO também corroborou o beneficiamento dessa suplementação (Tabela 7) (Figura 18)

Tabela 7: Dados complementares referentes à média do escaneamento de três plantas de cada tratamento. (T1: $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e 0,03% de carvão ativado; T2 $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA sem a suplementação de carvão ativado)

	T1	T2
Comprimento (mm)	2822,90	2159,97
Área (mm^2)	2264,43	1032,27
Diâmetro	2,58	2,61
Volume	144,64	113,79

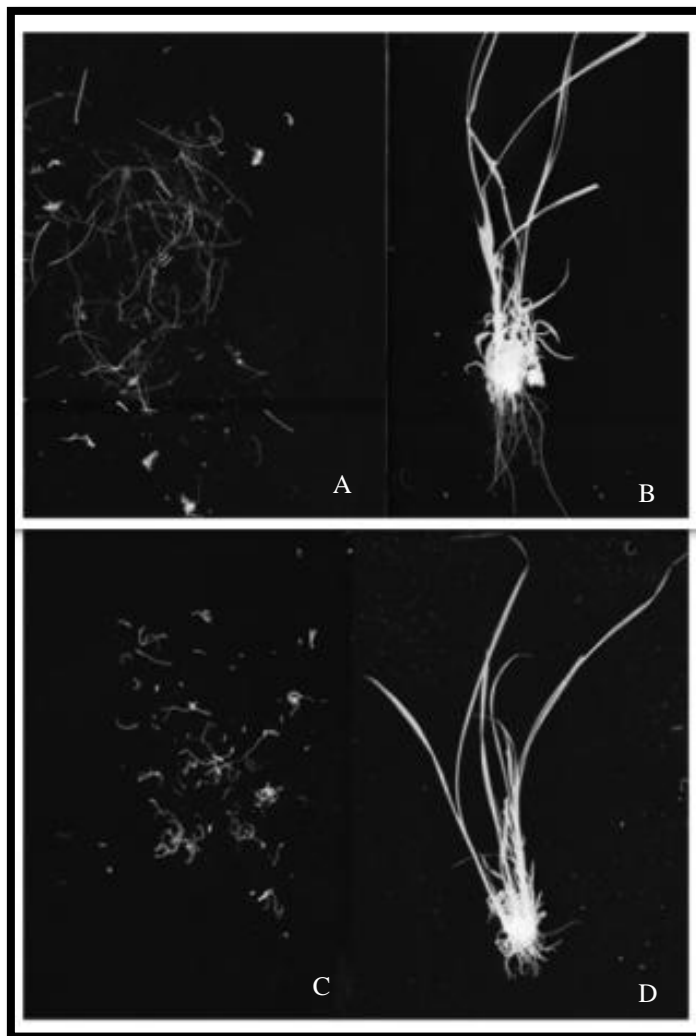


Figura 18: Efeito da suplementação com carvão ativado sobre plantas regeneradas de cana-de-açúcar. A) e B) Plantas enraizadas em meio contendo 0,03% de carvão ativado. C) e D) Plantas enraizadas em meio sem a suplementação de carvão ativado. Seropédica, 2014

O carvão ativado tem grande aplicação em culturas de tecidos, principalmente na restauração da capacidade embriogênica em calos envelhecidos, diminuição da intoxicação de explantes pelos fenóis oxidados produzidos pelos próprios tecidos *in vitro* e na estimulação do enraizamento (TORRES et al. 1998). A ele tem sido atribuída a capacidade de adsorção não seletiva de substâncias residuais nas culturas embriogênicas, sobretudo resíduos de reguladores de crescimento da fase de multiplicação, que podem influenciar na capacidade de enraizamento (THOMAS 2008).

É reconhecida a necessidade de uma concentração mínima de auxinas para a emissão de raízes, visto que sua presença em altas concentrações induzem a alongação da parte aérea e inibem a formação de raízes (TAIZ; ZEIGER, 2004). Por essa razão foi escolhida a concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA neste trabalho. Pandey et al. (2011) também obteve bons resultados ao utilizar a mesma concentração de ANA em cultivares micropropagadas de cana-de-açúcar.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a concentração de auxina ideal a ser utilizada é a mínima necessária para proporcionar uma iniciação radicular satisfatória, favorecendo assim o seu desenvolvimento sem estimular a formação de calos.

Conforme os estudos de Zanol et al. (1998) o enraizamento é beneficiado por uma curta manutenção dos explantes em escuro, uma vez que a luz tem efeito negativo sobre a formação das raízes. Essa condição foi alcançada neste trabalho através da utilização do carvão ativado, que impede o contato da luz com as raízes, beneficiando seu desenvolvimento.

Após 30 dias em meio de enraizamento as plantas foram aclimatadas sendo obtida 100% de sobrevivência (Figura 19).



Figura 19: Plantas regeneradas de cana-de-açúcar sob aclimação em substrato. Seropédica, 2014

5.6. Protocolo

5.6.1. Desinfestação

Retirar as bainhas mais externas e submergir os explantes em solução de álcool etílico 70% por 1 minuto seguido de 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo), sob agitação constante.

Após cada etapa de desinfestação, realizar a lavagem dos explantes com água destilada autoclavada. Em seguida, em condições assépticas na câmara de fluxo laminar, imergir os explantes em solução com hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo) por 20 minutos, seguido de tríplice lavagem em solução estéril de ácido cítrico a 150 mg.L^{-1} . Com auxílio de pinça e bisturi autoclavados, retirar as bainhas externas e seccionar os explantes em segmentos de 1 cm da parte mais basal.

5.6.2. Indução e Multiplicação da Embriogênese Somática

Incubar os explantes em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, 25 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 100 mg.L⁻¹ de PVP, solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Gelrite. Manter os tubos de ensaio em BOD, no escuro, sob a temperatura de 25° ± 2°C por 30 dias. Após 30 dias de incubação, referente à indução dos calos, realizar dois subcultivos das culturas formadas para meio de cultura novo, em placas de Petri, com a mesma composição. Manter as placas nas mesmas condições de cultivo por mais 30 dias. Tais subcultivos têm como objetivo a multiplicação das culturas embriogênicas.

5.6.3. Regeneração de Plantas

Para regeneração de plantas transferir os calos de aspecto embriogênico para placas de Petri contendo meio MS basal sem adição de reguladores de crescimento. Incubar em BOD, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com irradiância de 30 μmol.m⁻².s⁻¹, à 25° ± 2°C por 60 dias. Após 30 dias de incubação, transferir plantas para potes contendo o mesmo meio de cultura. Realizar repicagens a cada 15 dias para melhor desenvolvimento das plantas

5.6.4. Enraizamento e Aclimatização das plantas

Para indução de raízes utilizar meio MS basal acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e carvão ativo (0,03%). Incubar em BOD, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e oito horas de escuro, com irradiância de 30 μmol.m⁻².s⁻¹, à 25° ± 2°C por 30 dias. Após o desenvolvimento das raízes, lava-las em água corrente, para remoção do meio de cultura, transferir para vasos com areia e vermiculita e acondicionar em sala de crescimento à 25° ± 2°C, com irradiância de 250 μmol.m⁻².s⁻¹. Nos primeiros dias de aclimatização, tampar os vasos para minimizar a diferença de impacto do ambiente de cultivo.

6. CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho, por meio dos resultados obtidos, é possível concluir que para a desinfestação, a utilização de etapas com hipoclorito (1,25% de cloro ativo) e álcool etílico 70% foram fundamentais. A adição de outros componentes no processo como fungicida e bicloreto de mercúrio, prejudicou a indução de calos.

As brotações produzidas a partir da indução das gemas constituíram bons explantes, em função da rápida obtenção dos mesmos. Nas condições em que foram produzidas essas brotações, não foram detectadas diferenças nas concentrações de 2,4-D utilizadas, indicando que a concentração de 1 mg.L⁻¹ já é o suficiente para produção de calos. Também não foram encontradas diferenças entre o potencial de produção de calos de brotações originadas de ápice e base.

Para indução de calos de ápices caulinares (plantas *in vitro*), a concentração de 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D sem a suplementação de água de coco mostrou os melhores resultados. Como os resultados alcançados com a água de coco também foram bons, sugere-se usá-la com a concentração de 2,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

A suplementação do meio com AIA (4,0 mg.L⁻¹) não mostrou benefícios na multiplicação de culturas embriogênicas.

A maior taxa de regeneração de plantas foi alcançada em meio sem a adição de reguladores de crescimento. As plantas obtidas foram melhor enraizadas em meio contendo carvão ativado. Foi alcançada 100% de sobrevivência nas plantas aclimatadas.

Foi obtido um protocolo satisfatório de embriogênese somática indireta para a cultivar de cana-de-açúcar RB867515.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENCIBIA, A. et al. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp.* L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, v.7, p.213-222, 1998.
- ARENCIBIA, A. et al. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. **Plant Cell Reports**, v.14, n.5, p.305-309, 1995.
- ARENCIBIA, A. et al. Transgenic sugarcane plants resistant to stem-borer attack. **Molecular Breeding**, v.3, p.247-255, 1997.
- ARENCIBIA, A.; CARMONA, E. *Agrobacterium* Protocols. In **Molecular Biology Methods** v. 2, p. 227-235, 2006.
- ARNOLD, S. Somatic Embryogenesis In: **Plant Propagation by Tissue Culture**, GEORGE, E., p 335-354. Springer Netherlands, 479p, 2008
- ARVINTH, S., et al. Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with cry1Ab for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. **Plant Cell Reports**, v.29, p.383–395, 2010.
- ASAD, S., et al. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.1214-1218, 2009.
- BASNAYAKE, S.W.V., et al., Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, v.30, p.439-448, 2011.
- BEHERA, K.; SAHOO, S. Rapid *In vitro* Micro propagation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) Through Callus Culture. **Nature and Science**, v. 7, p.1-10, n. 4, 2009.
- BORTOLETO, J. F. **Modificação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) visando a produção de ácidos graxos conjugados**. Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), 145p., 2010.
- BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal**, v.2, p.409-416, 1992.
- BRAGA, D., et al. Expression of the Cry1Ab Protein in Genetically Modified Sugarcane for the Control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seed**, v.5, p.209-222, 2003.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, p.1-16, 2012.
- CARNEIRO, M. Melhoramento Molecular. **Revista Opiniões**. v. 8, p. 1-17, 2008

CESARINO, et al. An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. **Brazilian Journal of Botany**, v. 35, p. 303-311, 2012.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/bc48c2601447e03580b9e6bf62877e2a.pdf>>. Acesso em 10 de fev. 2014 às 15:00

CRUZ, K. Z. C. M. Otimização de protocolo na desinfestação de explantes foliares e micropropagação de *Aniba rosaeodora* - Ducke-" Uma espécie amazônica em risco de extinção." **Anais: Congresso de Iniciação Científica**, Cáceres/MT, v.8, p.20-24, 2013.

D'HONT, A. et al. Sugarcane: a major source of sweetness, alcohol, and bio-energy. In: MOORE, P.H, MING, R. (eds) **Plant genetics and genomics: crops and models**. Springer New York, v.1, p. 483–513, 2008.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed). **Sugarcane Improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, p.7-84, 1987.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetics and Genome Research**, v.109, p. 27–33, 2005.

DOWNING, K. et al. Biocontrol of the Sugarcane Borer *Eldana saccharina* by Expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* Genes in Sugarcane-Associated Bacteria Applied. **Environmental Microbiology**, v.66, n.7, 2804-2810, 2000.

ELDESSOKY et al. Establishment of regeneration and transformation system of sugarcane cultivar GT54-9 (C9). **GM Crops**, v.2, p.126-134, 2011.

FALCO, M. C., et al. Histological characterization of in vitro regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.2, p.93-97, 1996.

FILIPPI, S., et al., Variações Morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.711-716, 2001.

FRANKS, T; BIRCH, R. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.18, p.471-480, 1991.

GALLO-MEAGHER, M. et al., A thiadizuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. **In Vitro Cellular e Developmental Biology Plant**, Gaithersburg, v.36, p.37-40, 2000.

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

GUIDOLIN, F. A. **Regeneração de Plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens***. Dissertação Universidade de São Paulo, Piracicaba, 74p., 2003.

HANDA, L. et al. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* - Ducke). **Acta Amazonica**, v.35, n.1, p. 29-33, 2005.

HAQ, I. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **African Journal of Biotechnology**, v.4, p.206-209, 2005.

HEEDERT, E. **Indução a Embriogênese Somática em cana-de-açúcar**. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), p.55, 2008.

INGELBRECHT, I., et al. Posttranscriptional Gene Silencing in Transgenic Sugarcane. Dissection of Homology-Dependent Virus Resistance in a Monocot That Has a Complex Polyploid Genome. **Plant Physiology**, v.119, p.1187–1197, 1999.

ISHIDA, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. **Protocol, Nature**, v.2, p.1614 – 1621, 2007.

JESUS, F. A. **Transformação Genética de Cana-de-Açúcar com genes da aquaporina SspTIP1;1 e SspPIPI;4**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), 56p, 2010.

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.

JUNG, J.H, et al. RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass. **Plant Biotechnology Journal**. v.67-76, p.1067-76, 2012.

KHALIL, S. Regeneration via somatic embryogenesis and microprojectile-mediated co-transformation of sugarcane. **Arabian Journal of Biotechnology**, v.5 n.1, p.19-32, 2002.

KHAN, S., et al. *In vitro* regeneration, detection of somaclonal variation and screening for mosaic virus in sugarcane (*Saccharum* spp.) somaclones. **International Journal of the Physical Sciences**, v.11, n.48, p.10841-10850, 2012.

KHAN, S., et al. Optimization os explants sterilization condition in sugarcane cultivars. **Pakistan Journal of Agriculture**, v.20, n.3, 2007.

KIYOTA, E., et al. Analysis of soluble lignin in sugarcane by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a do-it-yourself oligomer database. **Analytical Chemistry**, v. 84, p.7015–7020, 2012.

KLIMASZEWSKA, K. Somatic embryogenesis: A reproduction method applicable to mature conifers, In: **Canadian Forest Service**, n. 61, 2010.

LAKSHMANAN, P. et al. 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. INVITED REVIEW: Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cell**, v.41, p.345–363, 2005.

- LAKSHMANAN, P., et al. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. In **in vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v.41, p.345-363, 2005.
- LANDELL, M.G.A.; BRESSIANI, J.A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: **Cana-de-açúcar**, DINARDO-MIRANDA, et al. (Ed.), 2008
- LEITE, R. et al. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol?. **Energy**, v.34,p.655–66, 2009.
- LÉON, E. A. B. **Germinação, estabelecimento, regeneração e calogênese *in vitro* em explantes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)**. Dissertação (Mestrado Engenharia Florestal), 2010.
- MACEDO, A. F. **Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar**. Universidade de São Paulo Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), 91p., 2010.
- MANICKAVASAGAM, M, et al. *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.
- MAYAVAN, S. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in plant seed transformation strategy in sugarcane. **Plant Cell Reports**, v.32, n. 0, p.1557-74, 2013.
- MELO, E. **Embriogênese somática em cana-de-açúcar e aspectos morfoanatômicos**. Universidade Federal de Viçosa. Tese (Doutorado em Fitotecnia), 74p., 2011 .
- MING, R. Sugarcane Improvement through Breeding and Biotechnology. **Plant Breeding Reviews**, v. 27, p.104, 2006.
- MUDRY, C. S. **Otimização de protocolos de indução da embriogênese somática em cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. Universidade Federal do Paraná. Dissertação (Mestrado em Ciências), 80 p., 2011.
- NASIR, I., et al. Herbicide-tolerant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants: an unconventional method of weed removal. **Turkish Journal Biology**, v. 38, 2014.
- NICKELL, L. G. Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. **Hawaii Plant Rec**, v.57, p.223–229, 1964
- NIEVES, N., et al. 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.
- OBREGÉN, et al. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds. **Biotecnologia Aplicada**, v. 14, p. 169-174, 1997.
- OZAWA, K. A High-Efficiency *Agrobacterium*-Mediated Transformation System of Rice (*Oryza sativa* L.). v.847, p.51-57, 2012.

PANDEY, et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues; sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.

PASSARIN, M.D. **Transformação Genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada.** Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), 148p., 2009.

PASTERNAK T.; et al. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia (Bratislava)**, v.57, p.5-12, 2002.

PICELLI, E. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene *Ddm1* no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar.** Universidade de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), 141p., 2010.

PMGCA. **Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar.** Viçosa, 2014. Disponível em: <http://www.canaufv.com.br/cultivaresRB/RB867515%20.pdf>. Acessado em 10 de fev de 2014 às 20:30.

PRICE, S. Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. VIII. Progenies from 112- and 136- chromosome *S. Officinarum* x *S. Spontaneum* hybrids. **Botanical Gazette**, v.124, p.186-190, 1963.

RABELO, et al. Aproveitamento de Resíduos Industriais In: **Cana-de-Açúcar, Bioenergia, Açúcar e Etanol – Tecnologias e Perspectivas.** BORÉM, et al., Universidade Federal de Viçosa, 637 p., 2012.

RAO, J.T.; BABU, C.N. Chromosome numbers in *Saccharum spontaneum* L. **Current Science**, v.24, p.53-54, 1955.

RATHUS, C; BIRCH, R. Stable transformation of callus from electroporated sugarcane protoplast. **Plant Science**, v.82, p.81-89, 1992.

RODRIGUES, A. et. al. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.1, p.131-133, 2003.

ROY, M. et al. Regeneration through somatic embryogenesis from leaf sheath derived callus os sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Plant Tissue e Biotechnology**. v.21, p.143-149, 2011.

SANTOS, et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v.35, n.5, p.1004-1010, 2012.

SARWAR, M; SIDDIQUI, S. In vitro conservation of sugarcane (*Saccharum officinarum* l.) germplasm. **Pakistan Journal. Botany**, v.36, n.3, p.549-556, 2004.

SILVA, M. I. **Embriogênese Somática Indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar.** Universidade Federal de Alagoas. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), 86p., 2012.

SILVA, M. M. A. **Embriogênese Somática Direta e Indireta em cana-de-açúcar: Busca de correlações com o estresse in vitro**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dissertação (Melhoramento Genético de Plantas), 75 p., 2010.

SILVA, V. S. **Regeneração in vitro de embriões de *Cocos nucifera* L.** Universidade de São Paulo. Dissertação, (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), 87p., 2002.

SNYMAN, S. J. et al. 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., et al. Araucaria augustifolia Biotechnology-Review. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, p.20-28, 2008

STEWART F.C. et al. Growth and organized development of cultured cells. II: organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**., v.45, p.705–708, 1958.

SUPRASANNA, P., et al. Profiling of culture-induced variation in sugarcane plants regenerated via direct and indirect somatic embryogenesis by using transposon- insertion polymorphism. **Sugar Technology**, v. 12, p. 26-30, 2010.

TAIZ, L; ZEIGER. E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Ed. Artmed, 2004.

THOMAS, T. D. The role activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v.26, p.618-631, 2008.

TORRES, A. C. **A Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 509 p. 1998.

VANHOLME et al., Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, v.153,p.895-905. 2010.

WAKASA, Y. et al. *Agrobacterium*-mediated co-transformation of rice using two selectable marker genes derived from rice genome components. **Plant Cell Reports**, v.31, p.2075-2084, 2012.

WAMAITHA, M. et al. 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.

YASMIN, A. et al. Optimization of a genotype independent media for organogenesis in calli of two sugarcane cultivars of Sindh. **Pakistan Journal Agricultural**. v.28, n.1, 2012.

ZIMMERMAM, J. Somatic Embryogenesis: A model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v.5 , p.1411-1423, 1993.

SUPLEMENTOS

Suplemento: 1 Quadro de análise de variância para formação de calos a partir de brotações de ápice e base de cana-de-açúcar, cv. RB867515

<i>F.V</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>
Entre grupos	0,317836	7	0,045405	0,616474
A x B	0,024332	1	0,024332	0,330364
dentro de A	0,16629	3	0,05543	0,752581
dentro de B	0,127214	3	0,042405	0,575737
Dentro dos grupos	3,167081	43	0,073653	1
Total	3,484918	50		

Suplemento: 2 Quadro de análise de variância para área de calos originados de ápices caulinares formados em meio com e sem suplementação de água de coco e quatro concentrações de 2,4-D (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹)

FV	GL	SQ	QM	F	Sig,
AC	1	0,396	0,396	3,100	0,081
DOSE	3	19,030	6,343	49,660	0,000*
AC*DOSE	3	3,769	1,256	9,830	0,000*
Dose/AC0	3	11,666	3,889	30,442	0,000*
Linear	1	10,076	10,076	78,878	0,000*
Quadrático	1	1,582	1,582	12,384	0,002*
Desvio	1	0,008	0,008	0,064	0,803
Dose/AC1	3	11,133	3,711	29,053	0,000*
Linear	1	1,362	1,362	10,659	0,003*
Quadrático	1	9,768	9,768	76,473	0,000*
Desvio	1	0,003	0,003	0,026	0,873*
ERRO(A)	24	3,066	0,128		1,000
AV	6	6,646	1,108	33,410	0,000*
AV*AC	6	0,331	0,055	1,660	0,135
AV*DOSE	18	5,246	0,291	8,790	0,000*
AV*AC*DOSE	18	0,809	0,045	1,360	0,163
Resíduo	144	4,774692	3,32E-02		

* Significativo a 1% (P<0,01)

Coefficiente de Variação: 37,69

Suplemento: 3 Quadro de análise de variância para sistema de notas dos calos originados de ápices caulinares formados em meio com e sem suplementação de água de coco e quatro concentrações de 2,4-D (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹)

FV	GL	SQ	QM	F	Sig.
AC	1	1,059	1,059	9,260	0,003*
DOSE	3	32,383	10,794	94,410	0,000*
AC*DOSE	3	6,318	2,106	18,420	0,000*
Dose/AC0	3	15,985	5,328	46,604	0,000*
Linear	1	9,965	9,965	87,159	0,000*
Quadrático	1	5,902	5,902	51,618	0,000*
Desvio	1	0,118	0,118	1,035	0,319
Dose/AC1	3	22,715	7,572	66,225	0,000*
Linear	1	0,195	0,195	1,709	0,204
Quadrático	1	22,209	22,209	194,244	0,000*
Desvio	1	0,311	0,311	2,722	0,112
ERRO(A)	24	2,744	0,114		
AV	6	2,130	0,355	8,860	0,000*
AV*AC	6	1,173	0,195	4,880	0,000*
AV*DOSE	18	4,882	0,271	6,770	0,000*
AV*AC*DOSE	18	2,164	0,120	3,000	0,000*
Resíduo	144	5,769	0,040		

* Significativo a 1% (P<0,01)

Coefficiente de Varianção: 37,69

Suplemento: 4 Quadro de análise de variância para formação da área embriogênica de calos originados de ápices caulinares desenvolvidos em meio de multiplicação com e sem a suplementação de AIA (4,0 mg.L⁻¹)

F	GL	SQ	QM	F	Signif
TR	2	1,500	0,750	16,807	0,000*
AIA	1	0,060	0,060	1,352	0,248
AV	3	1,238	0,413	9,246	0,000*
TR*AIA	2	0,108	0,054	1,206	0,305
TR*AV	6	0,713	0,119	2,663	0,021*
AV/TR1	3	1,332	0,444	9,947	0,000
Linear	1	1,269	1,269	28,443	0,000
Quadrático	1	0,006	0,006	0,125	0,724
Desvio	1	0,057	0,057	1,274	0,262
AV/TR2	3	0,619	0,206	4,624	0,005*
Linear	1	0,570	0,570	12,775	0,001*
Quadrático	1	0,019	0,019	0,430	0,514
Desvio	1	0,030	0,030	0,667	0,417
AV/TR3	3	0,000	0,000	0,000	1,000
Linear	1	0,000	0,000	0,000	1,000
Quadrático	1	0,000	0,000	0,000	1,000
Desvio	1	0,000	0,000	0,000	1,000
AIA*AV	3	0,037	0,012	0,274	*****
Resíduo	78	3,480	0,045	1,000	0,500

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

Suplemento: 5 Quadro de análise de variância do sistema de notas desenvolvidas para análise da área embriogênica de calos originados de ápices caulinares desenvolvidos em meio de multiplicação com e sem a suplementação de AIA (4,0 mg.L⁻¹)

FV	GL	SQ	QM	F	Signif.
TR	2	3,693	1,846	23,672	0,000*
AIA	1	0,111	0,111	1,424	0,236
AV	3	1,893	0,631	8,091	0,000*
TR*AIA	2	0,124	0,062	0,793	*****
TR*AV	6	1,029	0,172	2,200	0,052
Resíduo	78	6,083	0,078		

* Significativo a 1% (P<0,01)

Suplemento: 6 Quadro de análise de variância para regeneração de plantas originadas de calos de ápices caulinares

FV	GL	SQ	QM	F	Sig,
Total	23	460,958			
AIA	1	1,042	1,042	0,280	*****
ERRO(A)	10	37,417	3,742		
GA ₃ .BAP	1	408,375	408,375	337,970	0,000*
GA ₃ .BAP *AIA	1	2,042	2,042	1,690	0,223
Resíduo	10	12,083	1,208		

* Significativo a 1% (P<0,01)