



UFAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL**



CECA

MARCONDES INÁCIO DA SILVA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA DE DUAS VARIEDADES RB DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

RIO LARGO – AL

2012

MARCONDES INÁCIO DA SILVA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA DE DUAS VARIEDADES RB DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências do Programa de Pós – Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos

RIO LARGO – AL

2012

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Rosaline Paranhos da Silva

S586e Silva, Marcondes Inácio da.
Embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar /
Marcondes Inácio da da Silva. – 2012.
86 f. : il, graf., tab.

Orientador: Eurico Eduardo Pinto de Lemos.
Dissertação (Mestrado em Agronomia : Produção vegetal) – Universidade
Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2012.

Inclui bibliografias.
Apêndices: f. 65-71.

1. Saccharum officinarum. 2. Cultura de tecidos. 3. Embriões somáticos. I.
Título.

CDU: 633.61

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA DE DUAS VARIEDADES RB DE
CANA-DE-AÇÚCAR

MARCONDES INÁCIO DA SILVA

Dissertação defendida e aprovada em 27 de março de 2012 pela banca examinadora:

Orientador:

Prof. Ph.D. Eurico Eduardo Pinto de Lemos
Unidade Acadêmica CECA/UFAL

Examinadores:

Dr^a Ana da Silva Lédo
EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS

Prof. Dr. Júlio Alves Cardoso Filho
Unidade Acadêmica CECA/UFAL

Prof^a. Dr^a Leila de Paula Resende
Unidade Acadêmica CECA/UFAL

Ao meu Deus, por sempre ter me dado força, garra e sabedoria para conquistar meus principais objetivos.

Aos meus queridos pais, José Manoel e Alda, pelo amor, ensinamentos e orientações cruciais para minha formação como cidadão.

DEDICO

À minha namorada, Ariana, pelo amor, incentivo e compreensão durante o mestrado.

Ao meu irmão, Ubaquinã José, pelo apoio e solidariedade.

A todos os familiares e amigos que me incentivaram e torceram por mais essa conquista da minha vida.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alagoas, ótima instituição de ensino, que me proporcionou a oportunidade de ingressar no mestrado em produção vegetal e concluir mais esse sonho;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos, pelos ensinamentos e orientações prestadas neste mestrado, além da amizade estabelecida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao Prof. MSc. Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa, pela contribuição e apoio nas coletas dos materiais vegetais para realização dos experimentos;

Ao Prof. MSc. Iedo Teodoro, por ter cedido material vegetal para condução das pesquisas.

Ao Prof. Dr. Paulo Vanderlei Ferreira, pelas orientações relativas às análises estatísticas realizadas neste trabalho.

À Prof^{ta}. Dr^a. Leila de Paula Rezende, pelas suas orientações e amizade concedida;

Ao Prof. Dr. Júlio Alves Cardoso Filho, pela amizade e contribuição;

Aos Professores: Dr. João Correia Araújo Neto e Vilma Marques Ferreira, pela amizade, incentivo e ensinamentos.

Aos técnicos e funcionários do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar pelo apoio na condução das pesquisas e amizade;

Aos servidores do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Gilvânia Moreira da Silva e Hélio do Carmo Lima, pelo apoio e auxílio nas atividades laboratoriais.

Aos servidores do Programa de Pós-graduação do CECA/UFAL pela gentileza, prestatividade e amizade durante o curso.

Aos amigos: Edivânia de Lima Salvador, Giórgenns Klerysson Bezerra Silva, Israel de Almeida Canuto, Lamartine Silva Ferreira Júnior, Luiz Sérgio da Costa Duarte Filho, Maria Quitéria Cardoso dos Santos, Rychardson Rocha de Araújo, Rafael José Correia de Lima, Taciana de Lima Salvador, Tatiana de Lima Salvador e Welber Xavier, pela grande amizade, apoio e momentos de descontração compartilhados.

A todos os professores, funcionários e colegas do mestrado de Agronomia do CECA/UFAL.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para concretização deste objetivo.

MUITO OBRIGADO!

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

RESUMO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é cultivada em torno de 80 países do mundo, a qual é responsável por suprir aproximadamente 70% da demanda mundial por açúcar e ser uma alternativa na produção de combustível renovável. A embriogênese somática é uma ferramenta valiosa para os programas de melhoramento genético, podendo auxiliar nos estudos de fisiologia, genética e bioquímica. Este trabalho objetivou estabelecer as melhores concentrações de: sacarose; 2,4-D e carvão ativado, no processo de embriogênese somática para as variedades RB92579 e RB99395 de cana-de-açúcar. As variáveis analisadas foram: porcentagem de calos embriogênicos, qualidade dos calos embriogênicos e número de plantas regeneradas a partir dos embriões somáticos. Ápices caulinares, com 8 a 10 meses de idade, foram coletados, desinfestados e excisados até a obtenção do meristema apical envolvido por primórdios foliares. No primeiro experimento, foi avaliado o efeito de quatro concentrações de sacarose: 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹; no segundo experimento, o efeito de quatro concentrações de 2,4-D: 0, 3, 6 e 9 mg L⁻¹; e no terceiro experimento, o efeito de quatro concentrações de carvão ativado: 0; 0,75; 1,50 e 2,25 g L⁻¹. A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura foi indicada como a mais viável para as variedades estudadas no desenvolvimento de calos embriogênicos na fase escura. Os explantes cultivados sem 2,4-D ficaram marrons, não formaram calos e morreram após a terceira semana de cultivo. As concentrações de 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, utilizadas nos meios de cultura MS, foram as mais viáveis para as variedades RB92579 e RB99395 na formação e qualidade dos calos embriogênicos, assim como, no número de plantas regeneradas. O carvão ativado estimulou a germinação precoce parcial dos embriões ainda no escuro induzindo a rizogênese sobre os calos e reduzindo a qualidade dos mesmos. Houve uma correlação alta e positiva entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas. A resposta da variedade RB99395 ao processo de embriogênese somática foi superior a da variedade RB92579 nos três experimentos realizados, indicando que essa variedade tem maior potencial embriogênico.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, cultura de tecidos, embriões somáticos.

GENERAL ABSTRACT

The sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) is cultivated in about 80 countries around the world, which is responsible for supplying approximately 70% of world demand for sugar and for being an alternative to produce renewable fuel. Somatic embryogenesis is a valuable tool for breeding programs, which could benefit studies of physiology, genetics and biochemistry. This work aimed to establish the best concentrations of sucrose, 2,4-D and activated charcoal in the somatic embryogenesis of two varieties (RB92579 and RB99395) of sugar cane. The variables evaluated were: percentage of embryogenic calli, quality of embryogenic calli and number of regenerated plants from somatic embryos. The soft-end stem of 8 to 10 months-old plants were collected, disinfested and excised to obtain the apical meristem surrounded by few leaves primordia. In the first experiment, it was evaluated the effect of four concentrations of sucrose: 10, 20, 30 and 40 g L⁻¹; in the second experiment, the effect of four concentrations of 2,4-D: 0, 3, 6 and 9 mg L⁻¹; and in the third experiment, the effect of four concentrations of activated charcoal: 0; 0,75; 1,50 and 2,25 g L⁻¹. The concentration of 30 g L⁻¹ sucrose in the culture medium was indicated as the most feasible for the varieties in the development of embryogenic callus in the dark phase. The explants cultured in absence of 2,4-D were brown, did not produce callus and died after three weeks *in vitro*. The concentration of 3 mg L⁻¹ of 2,4-D added to the culture medium was designated as the best treatment to formation and quality of embryogenic calli, as well as the number of regenerated plants in both varieties. The activated charcoal stimulated an abnormal early germination of the embryos in the dark inducing root formation on the callus and reducing their quality. There was a high positive correlation between the quality of callus and the number of regenerated plants. The response to somatic embryogenesis of the variety RB99395 was significantly better than in the variety RB92579.

Keywords: *Saccharum officinarum*, tissue culture, somatic embryos.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

	Pág.
Figura 1. Processo de coleta, limpeza e excisão dos explantes para introdução à técnica da embriogênese somática. A) – Ápices caulinares coletados de canas com 8 a 10 meses de idade; B) – Palmitos extraídos dos ápices caulinares e tratados em solução de hipoclorito de sódio a 0,66% (v/v); C) – Excisão do meristema apical envolvido por primórdios foliares com aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro (indicado pela seta)	40
Figura 2. Escala de notas desenvolvida para avaliar a qualidade dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar, após oito semanas de cultivo no escuro	42
Figura 3. Tipos de calos obtidos durante o processo de embriogênese somática sob o efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura: A) – Embriogênico: amarelado, duro e compacto; B) - Não embriogênico: brilhante e mucilaginoso	45
Figura 4. A) - Pigmentos verdes de clorofila sobre os calos embriogênicos, indicando a germinação dos embriões somáticos; B) - Plantas, originadas dos embriões somáticos, em crescimento após três semanas de cultivo no claro; C) - Calos não embriogênicos com pigmentos arroxeados de antocianina, indicando que não há embriões em processo de germinação	45
Figura 5. Diferença estatística, de acordo com o teste F ($p < 0,001$), entre as duas variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em diferentes concentrações de sacarose; A) - em relação à porcentagem de calos embriogênicos; B) – em relação à qualidade dos calos embriogênicos; C) – em relação ao número de plantas regeneradas	47
Figura 6. Análises de regressão mostrando os efeitos das concentrações de sacarose sobre as variedades RB92579 e RB99395, no processo de embriogênese somática; A) - em relação à qualidade dos calos embriogênicos; B) – em relação ao número de plantas regeneradas	48
Figura 7. Equação de 1º grau mostrando a correlação existente entre a	

qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas.....	49
--	----

CAPÍTULO 2

	Pág.
Figura 1. Processo de coleta, limpeza e excisão dos explantes para introdução à técnica da embriogênese somática. A) – Ápices caulinares coletados de canas com 8 a 10 meses de idade; B) – Palmitos extraídos dos ápices caulinares e tratados em solução de hipoclorito de sódio a 0,66% (v/v); C) – Excisão do meristema apical envolvido por primórdios foliares com aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro (indicado pela seta)	56
Figura 2. Escala de notas desenvolvida para avaliar a qualidade dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar, após oito semanas de cultivo no escuro	58
Figura 3. Intumescimento e proliferação de células nas extremidades (distal - ED e proximal - EP) de explantes meristemáticos de cana-de-açúcar após 15 dias de cultivo em meio de cultura indutor de embriogênese somática com 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D	61
Figura 4. Escurecimento e morte dos tecidos de explante de cana-de-açúcar após 20 dias de cultivo em meio de cultura de indução à embriogênese somática sem 2,4-D	61
Figura 5. Calos não embriogênico (CNE) e intermediário (CI) após três semanas de cultivo em fotoperíodo de 16 horas e meio de cultura de germinação de embriões somáticos. A) – CNE necrosado; B) - CI com regeneração de plantas na área embriogênica e pigmentos antociânicos na área não embriogênica	62
Figura 6. Análise de regressão mostrando os efeitos das concentrações de 2,4-D sobre as variedades RB92579 e RB99395, no processo de embriogênese somática em relação à porcentagem de calos embriogênicos	63
Figura 7. Análises de regressão mostrando os efeitos das concentrações de 2,4-D sobre cada variedade estudada, no processo de embriogênese	

	somática, para a qualidade dos calos embriogênicos e para o número de plantas regeneradas	65
Figura 8.	Equação de 1º grau mostrando a correlação existente entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas.....	65

CAPÍTULO 3

	Pág.	
Figura 1.	Processo de coleta, limpeza e excisão dos explantes para introdução à técnica da embriogênese somática. A) – Ápices caulinares coletados de canas com 8 a 10 meses de idade; B) – Palmitos extraídos dos ápices caulinares e tratados em solução de hipoclorito de sódio a 0,66% (v/v); C) – Excisão do meristema apical envolvido por primórdios foliares com aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro (indicado pela seta)	72
Figura 2.	Escala de notas desenvolvida para avaliar a qualidade dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar, após oito semanas de cultivo no escuro	74
Figura 3.	Calo embriogênico da variedade RB99395, pouco desenvolvido (nota 1), originado do tratamento com 1,50 g L ⁻¹ de carvão ativado. A presença de raízes adventícias sobre a sua superfície (marcadas pelas setas) indica a germinação precoce de alguns embriões somáticos ainda na fase escura	77
Figura 4.	Emissão de plantas em calo embriogênico da variedade RB92579 originado do tratamento de maturação de embriões somáticos com 1,50 g L ⁻¹ de carvão ativado	78
Figura 5.	Diferença estatística, de acordo com o teste F, entre as duas variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado; A) – em relação à porcentagem de calos embriogênicos (p<0,005); B) – em relação à qualidade dos calos embriogênicos (p<0,030); C) – em relação ao número de plantas regeneradas (não significativo)	80
Figura 6.	Análises de regressão mostrando os efeitos das concentrações de	

carvão ativado sobre as variedades RB92579 e RB99395, no processo de maturação dos embriões somáticos; A) – em relação à porcentagem de calos embriogênicos; B) – em relação à qualidade dos calos embriogênicos; C) – em relação ao número de plantas regeneradas 81

Figura 7. Equação de 1º grau mostrando a correlação existente entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas..... 82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

	Pág.
Tabela 1. Resumo da análise de variância para a porcentagem de calos embriogênicos, qualidade dos calos embriogênicos e número de plantas regeneradas	46

CAPÍTULO 2

	Pág.
Tabela 1. Resumo da análise de variância para a porcentagem de calos embriogênicos, qualidade dos calos embriogênicos e número de plantas regeneradas	63
Tabela 2. Desdobramento da análise de variância para a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas	64

CAPÍTULO 3

	Pág.
Tabela 1. Resumo da análise de variância para a porcentagem de calos embriogênicos, qualidade dos calos embriogênicos e número de plantas regeneradas	79

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. A Cana-de-açúcar e o melhoramento genético	19
2.2. Cultura de tecidos	20
2.3. Embriogênese somática	22
2.4. Fatores que afetam a embriogênese somática	24
2.4.1. Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)	25
2.4.2. Carvão ativado	25
2.4.3. Sacarose	27
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO 1: Efeito da sacarose na embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar	37
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
CAPÍTULO 2: Efeito do 2,4-D na embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar	53
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CAPÍTULO 3: Efeito do carvão ativado na embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar	69

RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	70
INTRODUÇÃO.....	71
MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

INTRODUÇÃO GERAL

A transformação genética, a fusão de protoplastos, entre outras, são tecnologias importantes que os programas de melhoramento genético podem adotar para a obtenção de variedades agronomicamente superiores. Contudo, para que essas tecnologias possam ser aplicadas, é necessário que haja um sistema de produção de mudas bastante eficiente, sendo uma excelente alternativa as técnicas da cultura de tecidos (DESAI et al., 2004).

Uma das estratégias para o cultivo *in vitro* é a embriogênese somática, processo pelo qual células diplóides ou somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas (LITZ e GRAY, 1995; JIMÉNEZ, 2001).

As auxinas são apontadas como as principais substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos embriogênicos. Geralmente, esses fitohormônios induzem a formação de calos nos explantes e, em seguida, os calos são induzidos à embriogênese retirando-se ou reduzindo-se a concentração de auxina do meio de cultivo (SANI e MUSTAPHA, 2010); ou utilizando-se promotores de maturação de embriões como o carvão ativado, o ácido abscísico, o polietilenoglicol entre outros.

O carvão ativado é bastante utilizado como agente potencializador das respostas de maturação da embriogênese somática. Por adsorver substâncias inibitórias do meio de cultivo ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, propicia o desenvolvimento de embriões, podendo ser utilizado em diferentes culturas entre as concentrações de 0,2% a 3% (PASQUAL et al., 2001).

Além dos reguladores de crescimento, dos sais, das vitaminas e maturadores, os açúcares também são importantes na composição dos meios de cultura. A sacarose no meio de cultivo *in vitro* influencia vários processos metabólicos nas culturas e apresenta efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos (SKREBSKY et al., 2004).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é estudada em inúmeros programas de melhoramento genético. Em Alagoas, o Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA) da Universidade Federal de Alagoas desenvolve variedades, mais produtivas e resistentes aos fatores bióticos e abióticos, que são liberadas para o setor sucroalcooleiro.

Através dos protocolos de regeneração de plantas *in vitro* a partir da embriogênese somática, o uso da biotecnologia pode ser mais uma alternativa eficiente para o PMGCA à obtenção de novas variedades além dos processos convencionais de melhoramento genético.

Este trabalho objetivou estabelecer as melhores concentrações dos componentes: sacarose; auxina sintética 2,4-D; e carvão ativado, adicionados ao meio de cultivo indutor de embriogênese somática para as variedades de cana-de-açúcar RB92579 e RB99395.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cana-de-açúcar e o melhoramento genético

A cana-de-açúcar, espécie semiperene, alógama, pertencente a classe das monocotiledôneas, família *Poaceae* e ao gênero *Saccharum* (ROSSATO JÚNIOR, 2009), é originária do Sudeste Asiático, entretanto, é cultivada numa ampla faixa de latitudes e altitudes que variam desde o nível do mar até mil metros acima desse nível (MAGALHÃES, 1987).

Em torno de 80 países das regiões tropical, semitropical e subtropical do mundo cultivam a cana-de-açúcar, principalmente pela sua capacidade de armazenar, no colmo, altas concentrações de sacarose, a qual é responsável por suprir aproximadamente 70% da demanda mundial por açúcar e ser uma alternativa na produção de combustível renovável, o etanol (TEW e COBILL, 2008).

A cana-de-açúcar, misturada com a uréia, também pode ser utilizada como uma forragem destinada à alimentação animal. Além de apresentar uma excelente palatabilidade, que aumenta a aceitação pelo animal, essa espécie é muito rica em energia, a qual varia de acordo com o teor de sacarose presente no colmo (LIMA JÚNIOR et al., 2010).

Introduzida no Brasil no período colonial, transformou-se em uma das principais culturas de importância sócio-econômica para o país, sendo ele, não apenas o maior produtor mundial dessa commodity, como também, o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol (MAPA, 2012).

O Brasil, atualmente, possui uma área plantada, de cana-de-açúcar, em torno de 8,3 milhões de hectares, distribuídos em vários Estados, sendo que as principais regiões de cultivo são Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Sul (CONAB, 2011), permitindo duas safras ao ano por conta das condições climáticas. Portanto, durante o ano todo o Brasil produz açúcar e etanol para os mercados interno e externo (UNICA, 2012).

Em vista da grande importância mundial dessa monocotiledônea, ela está inserida em inúmeros programas de melhoramento genético em todo o mundo, sobretudo com o intuito principal de aumentar a produtividade, pois se além dos tratamentos culturais não for dada uma alta qualidade genética, o aumento da produção não pode ser alcançado (CESNIK e MIOCQUE, 2005).

A cana tradicionalmente cultivada, *Saccharum officinarum*, foi melhorada através de uma série de cruzamentos entre algumas espécies selvagens do gênero *Saccharum*, como consequência, as variedades de cana-de-açúcar, atuais, são altamente poliploides e aneuploides, com um número de cromossomos que varia de 100 a 130 (VETTORE et al., 2003).

As variedades “modernas”, ou seja, os híbridos interespecíficos (*Saccharum* spp), resultantes do melhoramento genético, mais resistentes aos agentes bióticos e melhor adaptadas às diversas condições ambientais, são utilizadas há décadas pelos produtores e são responsáveis pela expansão da cultura pelo mundo (MATSUOKA et al., 1999).

Através de melhoramento genético contínuo, a cana de açúcar se tornou uma das culturas mais eficientes do mundo na captação e conversão da energia solar em energia química (TEW e COBILL, 2008). Os programas de melhoramento genético têm relatado ganhos de produção de açúcar na ordem de 1 a 2% ao ano e têm atribuído a maior parte deste aumento à genética (EDMÉ et al., 2005).

As principais pesquisas de biotecnologia realizadas na cana-de-açúcar possuem foco na engenharia genética para obtenção de canas transgênicas; identificação de marcadores moleculares, associados às características agronômicas; e propagação clonal em biofábricas (LAKSHMANAN et al., 2005).

O emprego da biotecnologia no melhoramento genético da cana-de-açúcar depende de protocolos de regeneração *in vitro* a partir da cultura de tecidos, incluindo a embriogênese somática (CIDADE et al., 2006). A integração das técnicas de transformação genética e cultura de tecidos tem sido fundamental nos ganhos genéticos, a partir de genótipos superiores (LAKSHMANAN et al., 2005).

Embora a aplicação da biotecnologia para a melhoria genética das características da cana-de-açúcar ter um impacto significativo sobre os rendimentos agrícolas e produção industrial, o desenvolvimento de metodologias de engenharia genética com base na cultura de tecidos para obter variedades melhoradas não é ainda um processo de rotina nos programas de melhoramento (TIEL et al., 2006).

2.2 Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos vegetais pode ser entendida como um conjunto de técnicas que permite o cultivo de células, tecidos ou órgãos isolados da planta mãe em condições

de elevada assepsia e com rigoroso controle nutricional, de luminosidade e temperatura, em meio de cultura *in vitro* (GEORGE et al., 2008).

Um dos primeiros fundamentos que possibilitou a existência da cultura de tecidos foi a teoria da totipotência celular formulada, no século 19, por Matthias Schleiden e Theodor Schwann (CID, 2001). A teoria propõe que qualquer célula vegetal tem potencial genético para formar uma nova planta com carga genética igual à planta matriz, ou seja, um clone. Essa capacidade se manifesta quando a célula está sob condições especiais de estímulo (CID, 2001).

A cultura de tecidos pode dar suporte técnico a diversas áreas como a bioquímica, para estudo e elucidação de rotas metabólicas; a fisiologia vegetal, para estudos de crescimento e desenvolvimento das plantas; a fitopatologia, para estudos de toxinas, por exemplo; a citogenética, para estudos de cromossomos ou aberrações cromossômicas; entre outras áreas (CID, 2001).

O sucesso da aplicação desta técnica depende de uma série de fatores, que necessitam ser controlados adequadamente durante o processo, como meio de cultura, estado fisiológico da planta mãe de onde é retirado o explante e, sobretudo, da capacidade morfogênica do genótipo (DELPORTE et al., 2001; SAHARAM et al., 2004; COSTA et al., 2007).

O crescimento e a morfogênese de células e tecidos *in vitro* são regulados pela interação e pelo balanço entre as substâncias adicionadas ao meio de cultura e por aquelas produzidas de forma endógena pelas células dos explantes (CHAPLA et al., 2009).

Os primeiros estudos de cultura de tecidos em cana-de-açúcar foram realizados na década de 60 com a regeneração de plântulas a partir de calos (LIU, 1983). Anos mais tarde, Ho e Vasil (1983) conseguiram obter embriões somáticos a partir de segmentos de folhas jovens de cana.

Dentro de um programa de melhoramento vegetal, a cultura de tecidos pode ser empregada de diversas maneiras. No melhoramento de espécies que apresentam problemas de dormência de sementes, pode-se utilizar a técnica de germinação *in vitro*; quando o desenvolvimento do fruto é um processo prolongado, pode-se utilizar a cultura de embriões imaturos, na germinação, para acelerá-la entre outras aplicações (ANDRADE, 2002).

A cultura de tecidos, embora não atue diretamente na obtenção de cultivares, dá suporte às fases desse processo. Por exemplo, o desenvolvimento de protocolos

eficientes de propagação de plantas, através das técnicas de cultivo *in vitro*, é necessário para a transformação genética (LITZ e GRAY, 1995; DESAI et al., 2004). As principais características agronômicas manipuladas na transformação genética de cana-de-açúcar são a resistência ao ataque de insetos, fungos e viroses; a tolerância aos herbicidas; o aprimoramento da qualidade das fibras entre outras (GALLO-MEAGHER et al., 2000).

Entre as principais vantagens da propagação *in vitro* estão a rapidez em relação a outros métodos de propagação vegetativa, a produção de mudas livres de vírus e outros patógenos, além da possibilidade de sua utilização quando a propagação por técnicas convencionais for muito difícil de ser realizada (HO e VASIL, 1983; LITZ e GRAY, 1995).

Um dos caminhos da produção de plantas *in vitro* é a embriogênese somática, a qual diz respeito a formação de embriões a partir de tecidos somáticos (RAEMAKERS et al., 1995) ou, segundo Litz e Gray (1995), a partir de células únicas, evitando a ocorrência de quimeras.

2.3 Embriogênese somática

Embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem através de diferentes estágios embriogênicos dando origem a um embrião, que, por sua vez, irá originar uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

Durante esse processo, os embriões somáticos passam por estágios similares àqueles observados na embriogênese zigótica, caracterizando-se, também, como uma estrutura bipolar (HO e VASIL, 1983; RAEMAKERS et al., 1995), onde em uma extremidade serão diferenciadas as células do sistema radicular e, na extremidade oposta, serão diferenciadas as células que originarão as folhas e os ramos (NABORS et al., 1983; TERMIGNONI, 2005).

As embriogêneses somática e zigótica apresentam elevado nível de semelhança tanto na morfologia do embrião, como no padrão de expressão de genes e proteínas, qualificando a embriogênese somática como um modelo efetivo para estudos em diferentes estádios de desenvolvimento do embrião (ZIMMERMAN, 1993; LINACERO et al., 2001).

A embriogênese somática é uma técnica de grande aplicabilidade para os estudos básicos relacionados, desde, à fisiologia, genética e bioquímica do desenvolvimento embrionário, até a propagação clonal em massa, visando a conservação e o melhoramento genético das espécies (YEUNG, 1995; STEINER et al., 2008).

A embriogênese somática pode ser direta ou indireta. Na forma direta, os embriões somáticos são formados a partir de células que já estão determinadas e competentes para o desenvolvimento embriogênico, antes da condição de explante, sem a ocorrência da fase de calo. Na forma indireta, primeiro há uma fase de redeterminação das células diferenciadas do explante, seguida da ativação da divisão e proliferação celular, que levam à formação do calo e, na segunda fase, ocorre o desenvolvimento dos embriões a partir de determinadas células do calo (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986; SWEBY et al., 1994; GAJ, 2004).

Diferentes tipos de calos podem ser induzidos durante a embriogênese somática indireta, a saber: os calos embriogênicos que são de coloração amarelada, compactos e com aspecto duro; e os calos não embriogênicos que podem ser semitranslúcidos ou brilhantes, friáveis ou mucilaginosos (LAKSHMANAN, 2006).

Além da diferença morfológica, esses calos diferem entre si pelo potencial de regeneração de plantas (NABORS et al., 1983). O calo denominado embriogênico apresenta a formação de pequenos embriões somáticos capazes de regenerarem plantas completas, com raiz e parte aérea, visto que os mesmos são bipolares. Enquanto que o calo não embriogênico é aquoso e sem consistência e não apresenta a capacidade de regenerar plantas (NABORS et al., 1983; RASHID e QURAIISHI, 1989).

O tipo de calo e o seu potencial regenerativo, é influenciado por vários fatores incluindo: tipo de explante, genótipo, composição do meio e a seleção do tecido para subcultivo (RINES et al., 1992).

As fases da embriogênese somática indireta estão fortemente associadas aos reguladores de crescimento vegetal (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986), principalmente as auxinas e as citocininas, que estão envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação celular (FEHÉR et al., 2003).

Entre as duas formas de realização da embriogênese somática, a via direta é menos utilizada nas espécies, enquanto que, a via indireta é descrita para a maioria das espécies de importância econômica, a exemplo da cana-de-açúcar (RAEMAKERS et al., 1995). Segundo Gaj (2004), entre 124 protocolos de indução de embriogênese somática em diferentes espécies, apenas 30% é da forma direta.

A embriogênese somática é uma ferramenta valiosa para o melhoramento de espécies vegetais de importância comercial (GONZÁLEZ et al., 2012). Esta técnica vem sendo utilizada para a obtenção de plantas transgênicas (PRAKASH e VARADARAJAN, 1992; GAMA, 1993) e sementes sintéticas (SCHULTHEIS et al., 1990).

A embriogênese somática tem a capacidade de ser induzida a partir de protoplastos, suspensões celulares e culturas de calos, isso formou a base para uma efetiva exploração da engenharia genética para o melhoramento de cana-de-açúcar (LAKSHMANAN et al., 2005).

2.4 Fatores que afetam a embriogênese somática

A técnica da embriogênese somática envolve o estabelecimento de um explante na cultura, a proliferação de calos subsequentes (no caso da forma indireta), e a iniciação de embriões somáticos (VON ARNOLD et al., 2002). Mas para que isso aconteça muitas variáveis devem ser ajustadas nesse processo.

Para que ocorra a embriogênese somática é necessário que a célula ou o tecido vegetal sofra uma indução, pois as células somáticas não são naturalmente embriogênicas (NAMASIVAYAM, 2007). É das células competentes, ou seja, aquelas que se mostram sensíveis aos fatores de indução e capazes de desenvolver a embriogênese somática, que se formam os embriões (GAJ, 2004).

A técnica mais usual para indução da competência embriogênica consiste na exposição dos explantes a concentrações adequadas de auxinas durante períodos de tempo variáveis (HO e VASIL, 1983).

Entre as metodologias aplicadas na indução da embriogênese somática, há variações na composição dos meios de cultura, no tipo ou na concentração dos reguladores de crescimento, bem como no controle do ambiente da sala de cultivo e na densidade das células (PREECE, 1995).

O genótipo dos explantes também é uma variável extremamente relevante, no processo de formação de embriões somáticos, pois cada genótipo estudado pode apresentar requerimentos distintos de cultivo para a indução de estruturas embriogênicas (PREECE, 1995).

Além do material genético, é importante definir a fonte de explante a ser utilizada e a época da coleta, uma vez que vários tecidos da mesma planta ou tecidos em

diferentes estágios de desenvolvimento podem resultar em diferentes respostas à indução da embriogênese (HO e VASIL, 1983; LITZ e GRAY, 1995).

2.4.1 Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)

Dentre os reguladores de crescimento envolvidos na cultura de tecidos, a classe das auxinas é considerada a mais importante na indução e regulação da embriogênese somática por serem responsáveis pela desdiferenciação e rediferenciação das células (COOKE et al., 1993; GUERRA et al., 1999).

O 2,4-D é um regulador de crescimento da classe das auxinas utilizado na maioria dos estudos de cultura de células e tecidos embriogênicos (FEHÉR et al., 2003), em várias espécies, como a canela sassafrás (SANTA-CATARINA et al., 2001), batata doce (MAGALHÃES et al., 2006), aveia branca (BISPO et al., 2007), murici-pequeno (NOGUEIRA et al., 2007), entre outras.

Em cana-de-açúcar, este análogo da auxina também provou ser o mais eficiente na indução de calos embriogênicos (LAKSHMANAN et al., 2006). A alta especificidade do 2,4-D à indução de calos na cana-de-açúcar pode ser atribuída à presença de supostos receptores de 2,4-D presente na superfície da membrana celular do explante (SANI e MUSTAPHA, 2010).

O 2,4-D pode ser requerido em concentrações elevadas ou por períodos relativamente longos para iniciar a sequência de eventos que desencadeiam a embriogênese (VON ARNOLD e ERIKSSON, 1981).

Nos processos embriogênicos, aqueles explantes que são cultivados sem 2,4-D não se desenvolvem, ficam amarronzados e necrosam totalmente dentro de poucos dias de cultivo (TIEL et al., 2006; SANI e MUSTAPHA, 2010).

A presença de uma auxina para a indução de calos embriogênicos é imprescindível, entretanto a maturação e germinação dos embriões ocorrem na ausência ou em concentrações muito baixas dessa substância (HALPERIN e WETHERELL, 1964).

2.4.2 Carvão ativado

O carvão ativado, embora não seja um fitormônio, é utilizado frequentemente na cultura de tecidos com o objetivo de regular o crescimento das plantas (GEORGE,

1996). Na embriogênese somática tem importância na maturação dos embriões somáticos.

A embriogênese somática indireta pode ser dividida em duas fases básicas: a fase de indução de calos e a fase de maturação de embriões. A primeira ocorre em meio de cultura com elevadas concentrações de auxina, principalmente o 2,4-D; a segunda ocorre em meio com baixa ou nenhuma concentração de auxina e/ou com agentes maturadores de embriões como o ácido abscísico (ABA), agentes osmóticos e carvão ativado (STEINER et al., 2008).

O carvão ativado, utilizado em culturas *in vitro*, tem a propriedade de adsorver substâncias inibitórias como reguladores de crescimento residuais, compostos fenólicos presentes nos explantes, etileno, entre outras, potencializando as respostas de maturação dos embriões somáticos (MACEDO, 2010).

Compostos fenólicos geralmente são designados como substâncias inibidoras do desenvolvimento dos explantes, os quais devem ser evitados ou eliminados das culturas *in vitro* (PAN e STADEN, 1998).

A embriogênese somática indireta de cana-de-açúcar é bastante afetada pela exsudação dos compostos fenólicos produzidos pelos explantes (LORENZO et al., 2001). Esses compostos quando entram em contato com o oxigênio sofrem reações de oxidação e resultam em produtos tóxicos, que ocasionam o escurecimento e a necrose dos explantes, prejudicando o desenvolvimento dos calos (RODRIGUES, 2003).

A adição do carvão ativado aos cultivos embriogênicos promove o desenvolvimento dos calos provavelmente por absorver do meio de cultura os compostos fenólicos (FRIDBORG et al., 1978), as auxinas e citocininas (WEATHERHEAD et al., 1978) que inibem o desenvolvimento dos embriões somáticos.

Alguns métodos para impedir a acumulação de compostos fenólicos nas culturas *in vitro* têm sido recomendados. O método mais amplamente utilizado é a transferência dos explantes para meio fresco (PAN e STADEN, 1998). No entanto o risco de contaminação e o risco de mutações pelo aumento de subculturas é um problema. A utilização do carvão ativado nas culturas pode minimizar esse problema (PAN e STADEN, 1998).

Além disso, alguns autores relatam que o carvão ativado liberam substâncias naturalmente presentes na sua estrutura, que são benéficas para o crescimento da cultura *in vitro* (PAN e STADEN, 1998).

Diversos autores têm utilizado o carvão ativado nos processos embriogênicos em várias espécies de importância econômica, como soja (BUCHHEIM et al., 1989), cacau (VENTURIERI e VENTURIERI, 2004), *Piscea abies* (PULLMAN et al., 2005), cana-de-açúcar (MACEDO, 2010), entre outras.

2.4.3 Sacarose

A sacarose é o carboidrato mais utilizado na cultura de tecidos e suas ações sobre os explantes são bastante variadas. Esse carboidrato é utilizado mais comumente entre as concentrações de 2 e 3% (OZIAS-AKINS e VASIL, 1982).

Variações na concentração de sacarose no meio de cultura afetam as condições osmóticas e o metabolismo da planta *in vitro*, influenciando o crescimento e a diferenciação das culturas (KUMAR et al., 1984).

Na embriogênese somática, a sacarose tem sido a fonte de carbono mais empregada, embora outros mono e dissacarídeos também possam ser utilizados (MACIEL et al., 2003). Tem a capacidade de restaurar o potencial embriogênico das culturas através do aumento de sua concentração (JONES, 1974).

Vários autores já demonstraram os efeitos positivos da adição de sacarose em culturas embriogênicas de diferentes espécies de plantas como citros (BUTTON, 1978), cacau (TEIXEIRA et al., 2002; SANTANA et al., 2010), cana-de-açúcar (TAPIA et al., 1999).

As concentrações de sacarose estimulam a formação de calos embriogênicos (LU et al., 1982), influenciam nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (GUERRA et al., 1999) e reduzem a frequência de anormalidades de desenvolvimento tais como a formação de embriões secundários, a fasciação e a formação de policotilédones (AMMIRATO e STEWARD, 1971).

A sacarose, quando utilizada em altas concentrações na técnica da embriogênese somática, parece ter efeito comparável ao produzido pelo ácido abscísico (ABA) (LITZ e JARRET, 1991), isto é, desenvolvendo um papel regulatório aos estresses envolvendo perda de água (LINACERO et al., 2001). Uma vez que, nos últimos estádios da maturação do embrião há perda de água levando à dessecação e ao início do programa de dormência (LINACERO et al., 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRATO, P. V.; STEWARD, F. C. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. **Botanical Gazette**, v. 132, n. 2, p. 149-158, 1971.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16 p.

BISPO, N. B.; GRANDO, M. F.; AUGUSTIN, L. SUZIN, M. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 890-893, 2007.

BUCHHEIM, J. A.; COLBURN, S. M.; RANCH, J. P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. **Plant Physiology**, v. 89, n. 3, p. 768-775, 1989.

BUTTON, J. The effect of some carbohydrates on the growth and organization of citrus ovular callus. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.88, p.61-68, 1978.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2004, 307p.

CHAPLA, P. I.; BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; SILVA, J. M.; ROCHA, A. C. S.; STEFANELLO, S. pH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* LINDL. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2009.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 19. p. 16-21, 2001.

CIDADE, D. A. P.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2011/2012, terceiro levantamento, dezembro/2011**. Brasília, 2011, 20 p.

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

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P.; PEREIRA, J. E. S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 41-46, 2007.

DELPORTE, F.; MOSTADE, O.; JACQUEMIN, J. M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, n. 1, p. 73-80, 2001.

DESAI, N. S.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Current Science**, v. 87, n. 6, p. 764-768, 2004.

EDMÉ, S. J.; MILLER, J. D.; GLAZ, B.; TAI, P. Y. P.; COMSTOCK, J. C. Genetic contribution to yield gains in the Florida sugarcane industry across 33 years. **Crop science**, v. 45, n. 1, p. 92-97, 2005.

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

FRIDBORG, G.; PEDERSÉN, M.; LANDSTRÖM, L. E.; ERIKSSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 43, n. 2, p. 104-106, 1978.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.43, n. 1, p. 27-47, 2004.

GALLO-MEAGHER, M.; ENGLISH, R. G.; ABOUZID, A. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 36, n. 1, p. 37-40, 2000.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: Part 2 in practice. 2. ed. Somerset: Exegetics, 1996, p. 575-1361.

GEORGE, E. F.; MICHAEL, A. H.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure – Background. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed. Springer Science, New York, 2008, p. 1-28.

GONZÁLEZ, G. A.; PACHECO, M. G.; ONETO, C. D.; ETCHART, V. J.; KANDUS, M. V.; SALERNO, J. C.; EYHERABIDE, G.; PRESELLO, D.; LEWI, D. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2012.

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

HALPERIN, W.; WETHERELL, D. F. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. **American Journal of Botany**, v. 51, n. 3, p. 274-283, 1964.

HO, W. J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. the morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, v. 118, n. 3, p. 169-180, 1983.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 371-393.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.196-223, 2001.

JONES, L. H. Long term survival of embryoids of carrot (*Daucus carota* L.). **Plant Science Letters**, v. 2, n. 4, p. 221-224, 1974.

KUMAR, A.; BENDER, L.; NEUMANN, K. H. Growth regulation, plastid differentiation and the development of a photosynthetic system in cultured carrot root explants as influenced by exogenous sucrose and various phytohormones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 3, n. 1, p. 11-28, 1984.

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

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review ‘sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities’. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 42, n.3, p. 201-205, 2005.

LAKSHMANAN, P.; GEJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, 2006.

LIMA JÚNIOR, D. M.; MONTEIRO, P. B. S.; RANGEL, A. H. N.; MACIEL, M. V.; OLIVEIRA, S. E. O. Cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 5, n. 2, p. 13-20, 2010.

LINACERO, R.; LÓPEZ-BILBÃO, M. G.; VÁSQUEZ, A. M. Expression of different abscisic acid-responsive genes during somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protoplasma**, v. 217, n. 4, p. 199-204, 2001.

LITZ, R. E.; JARRET, R. L. Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos, embriogênese somática y organogênese. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones.**, Cali: CIAT, 1991, p. 143-172.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 416-425, 1995.

LIU, M. C. Sugarcane. In: SHARP, W. H.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan Publisher Co., 1983, v. 2, p. 572-605.

LORENZO, J. C.; BLANCO, M. A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2001.

LU, C.; VASIL, I. K.; OZIAS-AKINS, P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 62, n. 2, p. 109-112, 1982.

MACEDO, A. F. **Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MACIEL, A. L. R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C.; SILVA, A. B.; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. CV. obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107-116, 2003.

MAGALHÃES, A. C. N. Ecofisiologia da cana-de-açúcar: aspectos do metabolismo do carbono na planta. In: CASTRO, P. R. C.; FERREIRA, S. O.; YAMADA, T. (Ed.). **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Potafos, 1987. p. 113-118.

MAGALHÃES, J. S.; SANTOS, M. D. M.; CUNHA FILHO, F. N.; BLUMER, L.; GUERRA, M. P.; TORRES, A. C. Indução de embriogênese somática em genótipos de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 79-83, 2006.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Cana-de-açúcar**. 2012. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 06 mar 2012.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BOREN, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2 ed. Viçosa: UFV, 1999. p. 205-251.

NABORS, M.W.; HEYSER., J. W.; DYKES.. T. A.; DeMOTT, K. J. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. **Planta**, v. 157, n. 5, p. 385-391, 1983.

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

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K.; Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): evidence for somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 110, n. 2, p. 95-105, 1982

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 3, p. 155-163, 1998.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; DUTRA, L. F. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. 2001. 79 p. Monografia (Especialização em Cultura de Tecidos Vegetais: tecnologia e aplicações) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

PRAKASH, C. S., VARADARAJAN, U. Genetic transformation of sweetpotato. In: HILL, W. A.; BONSI, C. K.; LORETAN, P. A. (Ed). **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee University. 1992, p. 27-37.

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

PULMANN, G. S.; GUPTA, P. K.; TIMMIS, R.; CARPENTER, C.; KREITINGER, M.; WELTY, E. Improved norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, n. 5, p. 271-279, 2005.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v. 81, n. 1, p. 93-107, 1995.

RASCHID, H.; QURAIISHI, A. High frequency embryogenic callus induction and its regeneration in three wheat cultivars. In: MUJEEB-KAZI, A.; SITCH, L. A. (Ed.). **Review of advances in plant biotechnology, 1985-88**, 1989, p. 205-215.

RINES, H. W.; PHILLIPS., R. L.; SOMERS, D. A. Applications of tissue culture to oat improvement. In: MARSHALL, H. G.; SORRELLS, M. E. (Ed.). **Oat science and technology**, 1992, p. 777-791.

RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. L.; FACHINELLO, J. C.; SILVA, J. B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2003.

ROSSATO JÚNIOR, J. A. S. **Influência dos estressores bióticos *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) e *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) na produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar**. 61 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.

SAHARAN, V.; YADAV, R. C.; YADAV, N. R.; CHAPAGAIN, B. P. High frequency plant regeneration from desiccated calli of *indica rice* (*Oryza sativa* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 256-259, 2004.

SANI, L. A.; MUSTAPHA, Y. Effect of genotype and 2,4-D concentration on callogenesis in sugarcane (*Saccharum spp.* Hybrids). **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, Kano, v. 3, n. 1, p. 238-240, 2010.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S. C.; PEDROTTI, E. L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorífera* Mez). **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 501-510, 2001.

SANTANA, G. F.; SALAZAR, R. V.; MATA, J. Efecto de la fuente de carbono sobre la organogénesis y embriogénesis somática em cacao. Análisis citogenético. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 60, n. 2, p. 193-202, 2010.

SCHULTHEIS, J. R.; CANTLIFFE, D. J.; CHEE, R. P. Optimizing sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] root and plantlet formation by selection of proper embryo developmental stage and size, and gel type for fluidized sowing. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 7, p. 356-359, 1990.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v.34, n. 5, p.1471-1477, 2004.

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

SWEBY, D. L.; HUCKETT, B. I.; BOTHA, F. C. Minimising somaclonal variation in tissue cultures of sugarcane. **Proceedings of The South African Sugar Technologists Association**, v. 1, p. 46-50, 1994.

TAPIA, R.; CASTILLO, R.; NIEVES, N.; BLANCO, M. A.; GONZÁLEZ, J. L.; SÁNCHEZ, M.; RODRÍGUEZ, Y. Inducción, maduración y encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum Sp.*) var Cp 5243. **Bioteecnología Aplicada**. v. 16, n. 1, p. 20-23, 1999.

TEIXEIRA, J.B., MARBACH, P.A.S.; SANTOS, M. de O. **Otimização da metodologia da embriogênese somática visando à propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 34p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 79).

TERMIGNONI, R. R.; **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005, 182p.

TEW, T. L.; COBILL, R. M. Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum* spp) as an energy crop. In: VERMERRIS, W. (Ed.). **Genetic improvement of bioenergy crops**. Springer Science, New York, 2008, p. 249-272.

TIEL, K.; ENRÍQUEZ, G. A.; CEBALLO, Y.; SOTO, N.; FUENTES, A. D.; FERREIRA, A.; COLL, Y.; PUJOL, M. Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. **Biotecnología Aplicada**, v. 23, n. 1, p. 22-24, 2006.

TORRES, A.C.; DUVAL, F.G.; RIBEIRO, D.G.; BARROS, A.F.F.; ARAGÃO, F.A.D. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata* *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.789-792, 2005.

UNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar). **Setor Sucroenergético – Histórico – Cultivo da cana hoje**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=9E97665F-3A81-46F2-BF69-26E00C323988>> Acesso em: 07 mar 2012.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 4, p. 507-511, 2004.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; SOUZA, G. M.; SILVA, A. M. et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v. 13, p. 2725-2735, 2003.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, n. 5, p. 870-874, 1981.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L.. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, n. 3, p. 233-249, 2002.

WEATHERHEAD, M. A.; BURDON, J.; HENSHAW, G. G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. **Z. Pflanzenphysiol**, v. 89, p. 141-147, 1978.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v. 57, n. 4, p. 443-462, 1986.

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

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1411-1423, 1993.

CAPÍTULO 1

Efeito da sacarose na embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar

RESUMO

A sacarose tem sido o carboidrato mais utilizado na embriogênese somática, influenciando nos processos de indução, maturação e diferenciação dos embriões somáticos. Os efeitos positivos da adição desse carboidrato nos meios de cultivo de embriões somáticos têm sido demonstrados em diferentes espécies de plantas, inclusive na cana-de-açúcar. Este trabalho teve por objetivo determinar as melhores concentrações dessa fonte de carbono no processo de embriogênese somática para as variedades RB92579 e RB99395. Ápices caulinares, com 8 a 10 meses de idade, foram coletados e levados para o laboratório, onde foram higienizados e dissecados até a obtenção do meristema apical envolvido por primórdios foliares. Os explantes foram colocados em meios de cultura indutores de embriogênese somática compostos por quatro concentrações de sacarose: 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. A porcentagem de calos embriogênicos e a qualidade dos calos embriogênicos foram avaliadas após oito semanas no escuro; o número plantas regeneradas a partir dos embriões somáticos, após sete semanas no claro. A variedade RB99395 se comportou de forma superior em todas as variáveis estudadas. O número de plantas regeneradas na fase clara, nas duas variedades, teve correlação alta e positiva com a qualidade dos calos embriogênicos formados na fase escura. A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura foi indicada como a mais viável para as variedades estudadas no desenvolvimento de calos embriogênicos na fase escura.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, micropropagação, cultura de tecidos.

Effect of sucrose on indirect somatic embryogenesis of two RB varieties of sugarcane

ABSTRACT

Sucrose has been the most widely used carbohydrate in somatic embryogenesis, influencing its processes of induction, maturation and differentiation. The positive effects of the use of this carbohydrate in the culture media have been demonstrated in different plant species including sugar cane. This study aimed to determine the best concentration of this carbon source in the process of somatic embryogenesis for the sugar cane varieties RB92579 and RB99395. The soft-end stems of 8-10 months-old plants were collected in the field and taken to the laboratory where they were cleaned and dissected to obtain the apical meristem surrounded by few leaves primordia. These explants were placed in culture media with four concentrations of sucrose, 10, 20, 30 and 40 g L⁻¹. The percentage and the quality of embryogenic calli were evaluated after eight weeks in the dark; the number of regenerated plants was evaluated after seven weeks in a 16 hours photoperiod. The variety RB99395 behaved superior in all the variables studied. The number of regenerated plants in the light phase, in both varieties had high positive correlation with the quality of the embryogenic calli formed during the dark phase. The concentration of 30 g L⁻¹ sucrose in the culture medium was indicated as the most feasible for both varieties to develop embryogenic callus in the dark phase.

Keywords: *Saccharum officinarum*, micropropagation, tissue culture.

INTRODUÇÃO

Os componentes básicos dos meios de cultura envolvem os macro e micro nutrientes, os açúcares, as vitaminas e os reguladores de crescimento. A sacarose tem sido o carboidrato mais utilizado na embriogênese somática, suas concentrações influenciam nos processos de indução, maturação e diferenciação dos embriões somáticos (GUERRA et al., 1999; TAPIA et al., 1999).

Essa fonte de carbono é alvo de muitos estudos na cultura de tecidos, vários autores já demonstraram os efeitos positivos da adição de sacarose nos meios de cultivo de embriões somáticos em diferentes espécies de plantas (HU e FERREIRA, 1998; TAPIA et al., 1999; TORRES et al., 2005).

Button (1978) observou que a sacarose promove bom crescimento de calos embriogênicos em citros; Teixeira et al. (2002) e Santana et al. (2010) relataram o efeito benéfico da sacarose na formação de embriões em cacau; Tapia et al. (1999) também observaram o efeito positivo da sacarose na indução e maturação de embriões somáticos de cana-de-açúcar.

Apesar de a sacarose ser altamente metabolizável, tem-se comprovado que as altas concentrações desse açúcar atuam como um agente osmótico (ROCA et al., 1991), suprimindo o desenvolvimento dos explantes possivelmente pela redução da absorção de água e de nutrientes do meio de cultura.

A sacarose, quando utilizada em altos níveis na técnica de embriogênese somática, parece ter efeito comparável ao produzido pelo ácido abscísico (LITZ e JARRET, 1991). Esse fitormônio é amplamente utilizado para estimular o processo de maturação dos embriões somáticos (SALAJOVA et al., 1999).

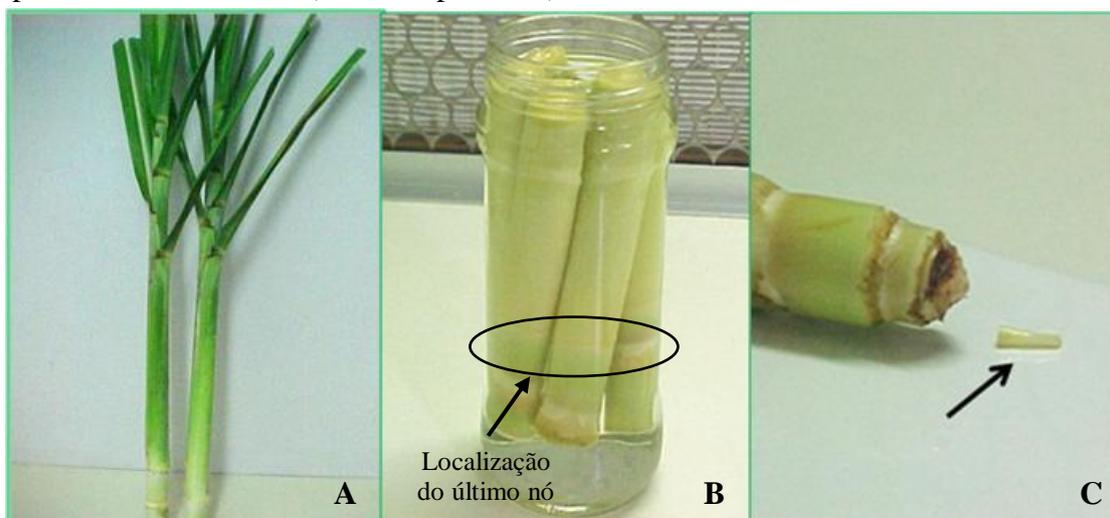
Este trabalho teve por objetivo determinar as melhores concentrações dessa substância no processo de embriogênese somática para as variedades RB92579 e RB99395 utilizadas no Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar do CECA-UFAL, de modo a ampliar os conhecimentos sobre a relação entre essa fonte de carbono e o desenvolvimento dos calos embriogênicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ápices caulinares de cana-de-açúcar das variedades RB92579 e RB99395, com 8 a 10 meses de idade (Figura 1A), foram coletados em área experimental do Centro de Ciências Agrárias (CECA/UFAL), localizado na BR 104 Norte, Km 85, Rio Largo – AL e em seguida levados para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BIOVEG), do CECA, onde o experimento foi realizado.

No BIOVEG, os ápices foram reduzidos até a obtenção do palmito, isto é, um conjunto de folhas jovens enroladas concentricamente no ápice caulinar das plantas. Os palmitos, com cerca de 15 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, contendo o último nó sobre o qual está localizado o meristema apical (Figura 1B), foram inicialmente lavados em água corrente e enxaguados em água destilada. Na câmara de fluxo laminar, foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 0,66% (v/v) por 20 minutos e enxaguados com água destilada estéril por três vezes. Sobre ladrilhos autoclavados, os palmitos foram excisados individualmente, utilizando-se pinça e bisturi, até a obtenção do meristema apical envolvido por alguns primórdios foliares (Figura 1C).

Figura 1. Processo de coleta, limpeza e excisão dos explantes para introdução à técnica da embriogênese somática. A) – Ápices caulinares coletados de canas com 8 a 10 meses de idade; B) – Palmitos extraídos dos ápices caulinares e tratados em solução de hipoclorito de sódio a 0,66% (v/v); C) – Excisão do meristema apical envolvido por primórdios foliares com aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro (indicado pela seta). Fotos: Marcondes Inácio da Silva.



Os explantes, com aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro, foram introduzidos, horizontalmente, em frascos de vidros (10 x 8 cm) contendo 30 mL de meio de cultura, composto pelos sais e vitaminas MS

(MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, 50 mg L⁻¹ de arginina e 50 mL L⁻¹ de água de coco, no qual foram testadas quatro concentrações de sacarose: 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. Todos os meios de cultura foram gelificados com 2,5 g L⁻¹ de gelrite, autoclavados a 121 °C e a 1 atm por 20 minutos com pH previamente ajustado em 5,8. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 (2 variedades x 4 concentrações de sacarose) com 3 repetições. Cada parcela foi composta por seis frascos contendo um explante em cada um.

Para a indução de calos embriogênicos, os explantes foram mantidos no escuro sob temperatura de 25 ± 1 °C em estufa de crescimento (tipo BOD), durante oito semanas, sendo que, nas últimas três semanas, os explantes foram transferidos para meio de cultura com 0,25 mg L⁻¹ de 2,4-D para a maturação dos embriões, mantidas as concentrações de sacarose dos tratamentos e os outros componentes utilizados.

Para impedir que a oxidação dos explantes, provocada pela exsudação dos compostos fenólicos, avançasse para todo o meio de cultura e provocasse maior nocividade ao desenvolvimento dos calos, a cada quatro dias, até os primeiros 20 dias de cultivo, os explantes eram reposicionados dentro dos frascos de cultura, de modo que os explantes permanecessem em áreas “limpas” do meio de cultura.

Após as oito semanas nos meios de indução à embriogênese somática, os calos embriogênicos foram transferidos para meio de cultura MS enriquecido com 0,1 mg L⁻¹ de cinetina, 0,2 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 30 g L⁻¹ de sacarose, sob temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 50 μmol/m² s⁻¹, durante três semanas para a germinação dos embriões somáticos. Em seguida, as culturas foram transferidas para meio MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de Ácido Giberélico (GA₃) e 30 g L⁻¹ de sacarose, mantidas as condições de temperatura e luminosidade, onde permaneceram por mais quatro semanas para o crescimento das plantas.

A porcentagem de calos embriogênicos e a qualidade dos calos embriogênicos foram avaliadas no final da fase escura; o número de plantas regeneradas a partir dos embriões somáticos, após a fase clara. Para a avaliação da qualidade dos calos embriogênicos foi desenvolvida uma escala de notas variando de 0 a 4 (Figura 2).

Figura 2. Escala de notas desenvolvida para avaliar a qualidade dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar, após oito semanas de cultivo no escuro. Fotos: Marcondes Inácio da Silva

Notas	Características
 <p>0</p>	Tecido vegetal sem alterações ou calos não embriogênicos
 <p>1</p>	Menos de 25% da área do explante ocupada por massa embriogênica
 <p>2</p>	Entre 25 e 50% da área do explante ocupada por massa embriogênica
 <p>3</p>	Entre 50 e 75% da área do explante ocupada por massa embriogênica
 <p>4</p>	Mais de 75% da área do explante ocupada por massa embriogênica

Os dados obtidos das variáveis foram avaliados estatisticamente por meio de análise de variância e ajustados a curvas de regressão. Os dados das notas relativas às qualidades dos calos embriogênicos foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$, os demais dados não foram transformados. Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fase inicial da formação de calos na cana-de-açúcar foi caracterizada por uma intensa oxidação dos explantes, especialmente aqueles da variedade RB99395. A oxidação desses explantes provavelmente ocorreu pelo fato da cana-de-açúcar apresentar teores elevados de compostos fenólicos nos seus tecidos (PAYET et al., 2005; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Os fenóis exsudados pelas células lesionadas, em contato com o oxigênio sofrem reações de oxidação e resultam em produtos tóxicos, ocasionando o escurecimento e a necrose dos explantes (RODRIGUES, 2003). Esses fenóis interferem negativamente na formação de calos, principalmente nas três primeiras semanas; Beruto et al. (1996) constataram que a não regeneração de calos em *Ranunculus asiaticus* L. foi devido ao alto índice de polímeros fenólicos; semelhantemente, estudos de embriogênese somática em diferentes genótipos de cacau realizados por Santana et al. (2010) mostraram que grande parte dos explantes necrosados não formaram calo, provavelmente pelo efeito inibitório apresentado pelos compostos fenólicos no crescimento de tecidos.

Neste trabalho, o efeito prejudicial dos fenóis foi minimizado quando os explantes foram reposicionados a cada quatro dias, até o 20º dia, dentro dos frascos de cultura, de forma que a oxidação da área lesionada não abrangesse todo o meio de cultura e assim os explantes permanecessem em áreas “limpas” do meio.

As primeiras alterações visíveis nos explantes iniciaram na segunda semana, com o intumescimento dos tecidos seguido de intensa proliferação de células. O aumento da massa de calos foi mais expressivo depois da terceira semana; Lorenzo et al. (2001), verificaram que a exsudação de fenóis em explantes meristemáticos de cana-de-açúcar ocorria com maior intensidade nos primeiros 20 dias de cultivo; ou seja, possivelmente durante essa fase inicial os fenóis limitaram a formação de calos.

Nos tratamentos estudados neste experimento foram obtidos calos embriogênicos e calos não embriogênicos (Figura 3). Os calos embriogênicos, quando foram colocados na presença de luz (fotoperíodo de 16 horas), sofreram alterações morfológicas visíveis logo na primeira semana de cultivo. Tais alterações incluíram o aparecimento de pigmentos esverdeados, indicando a presença de clorofila nos embriões maduros e a sua conseqüente germinação e crescimento, originando plantas (Figura 4 A, B). Por outro lado, os calos não embriogênicos apresentaram pigmentos arroxeados, indicando a presença de antocianinas sobre a área calejada, esses calos não originaram

plantas (Figura 4C). Resultados semelhantes foram descritos por Macedo (2010) em estudos de maturação de calos embriogênicos e não embriogênicos de cana-de-açúcar.

Figura 3. Tipos de calos obtidos durante o processo de embriogênese somática sob o efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura: A) – Embriogênico: amarelado, duro e compacto; B) - Não embriogênico: brilhante e mucilaginoso. Fotos: Marcondes Inácio da Silva.

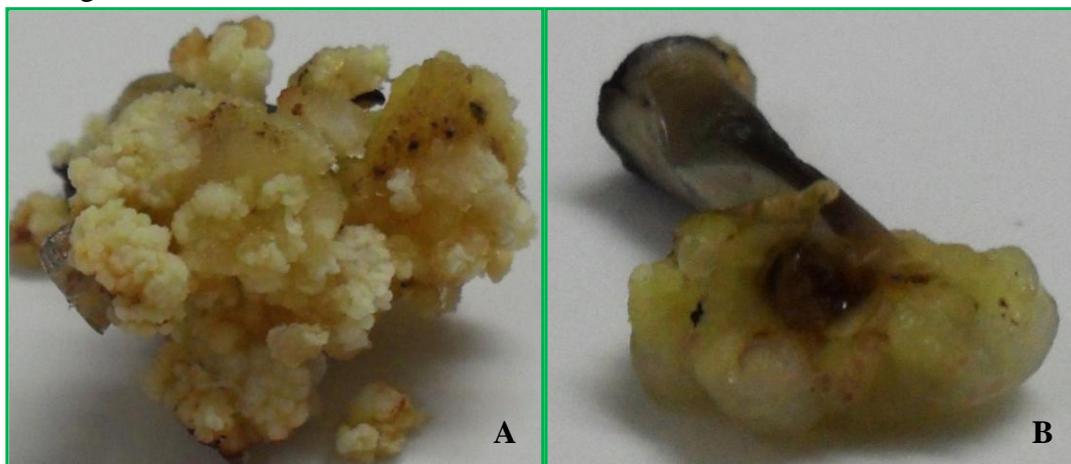
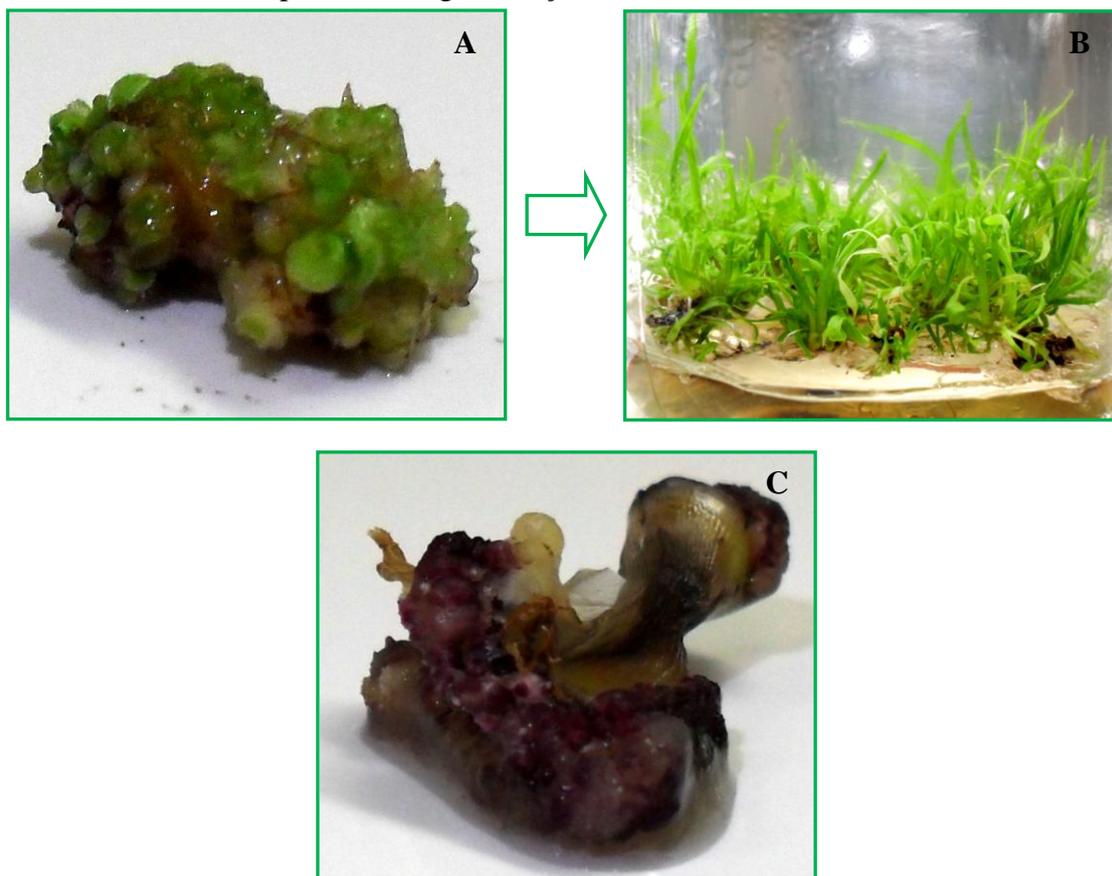


Figura 4. A) - Pigmentos verdes de clorofila sobre os calos embriogênicos, indicando a germinação dos embriões somáticos; B) - Plantas, originadas dos embriões somáticos, em crescimento após três semanas de cultivo no claro; C) - Calos não embriogênicos com pigmentos arroxeados de antocianina, indicando que não há embriões em processo de germinação. Fotos: Marcondes Inácio da Silva.



De acordo com a análise de variância (Tabela 1), não houve interação significativa entre as variedades e as concentrações de sacarose estudadas no processo de embriogênese somática, em relação às três variáveis analisadas, indicando que esses dois fatores são independentes e, portanto, devem ser analisados separadamente.

As variedades RB92579 e RB99395 de cana-de-açúcar diferiram significativamente, pelo teste F, em relação à porcentagem de calos embriogênicos formados ($p < 0,001$), à qualidade dos calos embriogênicos ($p < 0,001$) e ao número de plantas regeneradas a partir dos embriões somáticos ($p < 0,001$).

As regressões linear e quadrática e o desvio de regressão não tiveram efeitos significativos para a porcentagem de calos embriogênicos. Por outro lado, as regressões linear e quadrática tiveram efeitos altamente significativos tanto para a qualidade dos calos embriogênicos ($p < 0,001$ e $p < 0,016$), respectivamente, como para o número de plantas regeneradas ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), respectivamente. Para essas variáveis, o desvio de regressão não teve efeito significativo (Tabela 1).

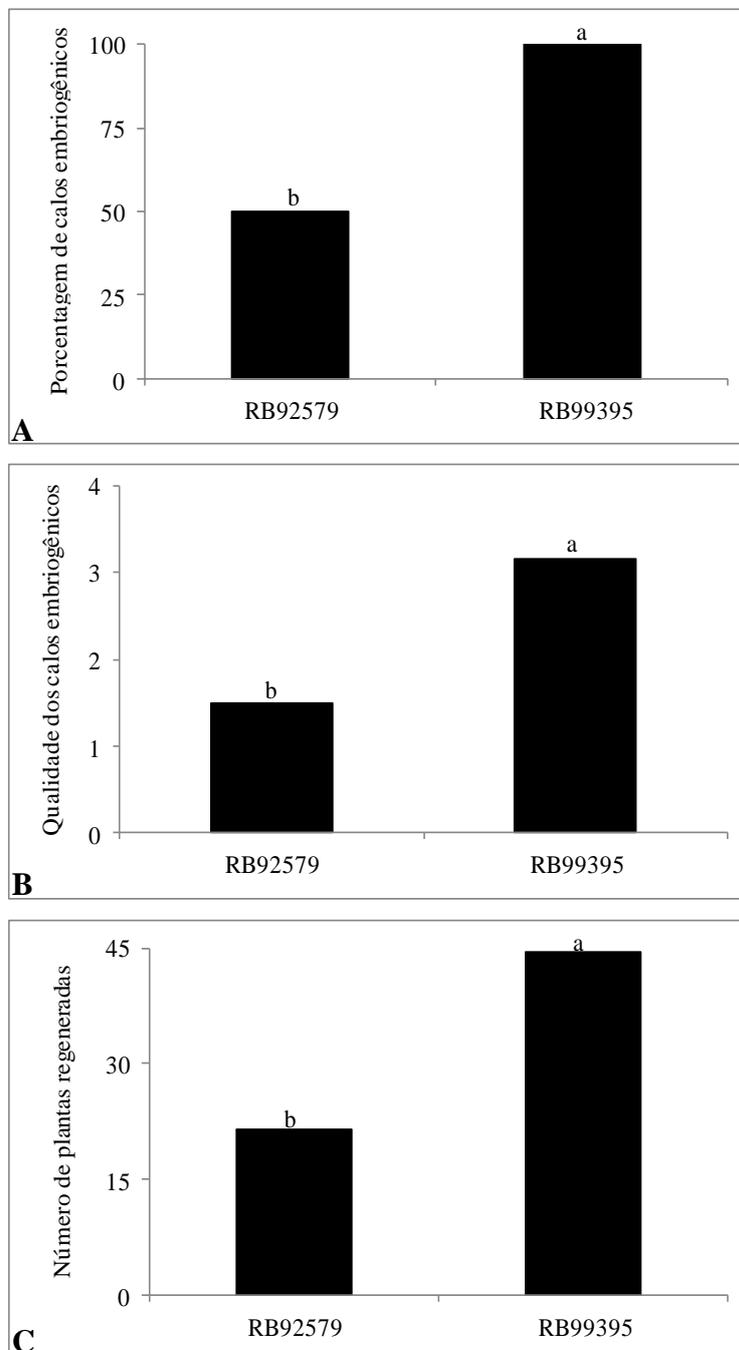
Tabela 1. Resumo da análise de variância para a porcentagem de calos embriogênicos, qualidade dos calos embriogênicos e número de plantas regeneradas.

Causa de variação	GL	Quadrados médios e (Probabilidades)		
		Porcentagem de CE	Qualidade dos CE	Nº de plantas regeneradas
Variedades (F1)	1	15000,0000 ($p < 0,001$)	1,6705 ($p < 0,001$)	3143,4070 ($p < 0,001$)
Conc. de sacarose (F2)	(3)	185,9267 ^{ns}	0,1969 ($p < 0,001$)	873,3704 ($p < 0,001$)
Reg. Linear	1	334,6680 ^{ns}	0,4918 ($p < 0,001$)	2167,5001 ($p < 0,001$)
Reg. Quadrática	1	185,9267 ^{ns}	0,0935 ($p < 0,016$)	357,7963 ($p < 0,001$)
Desvio de regressão	1	37,1853 ^{ns}	0,0054 ^{ns}	94,8148 ^{ns}
Interação F1 x F2	3	185,9267 ^{ns}	0,0152 ^{ns}	41,7902 ^{ns}
Tratamentos	7	2302,2228 ($p < 0,001$)	0,3296 ($p < 0,001$)	841,2698 ($p < 0,001$)
Resíduo	16	139,4450	0,0129	24,1111
Total	23			
CV (%)		15,74	6,92	14,88

NOTA: (ns) - não significativo: $p > 0,05$.

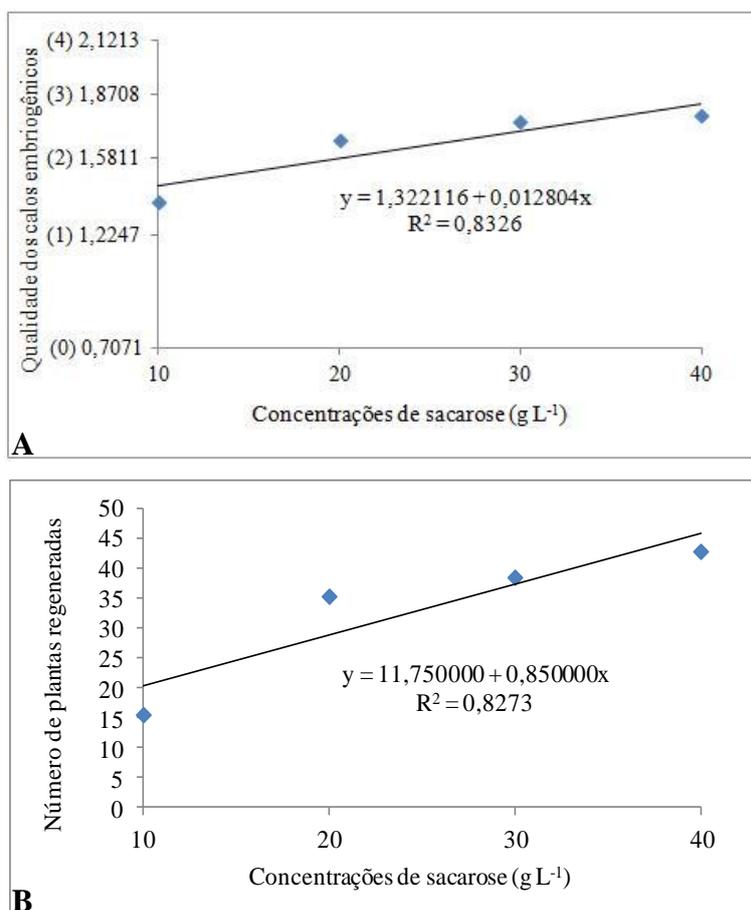
De acordo com o teste F ($p < 0,001$), a variedade RB99395 se comportou de forma superior em todas as variáveis estudadas (Figura 5). Esses resultados confirmaram o que inúmeros autores já relataram sobre a influência do genótipo na resposta embriogênica dos explantes (GANDONOU et al., 2005; CIDADE et al., 2006; LAKSHMANAN et al., 2006).

Figura 5. Diferença estatística, de acordo com o teste F ($p < 0,001$), entre as duas variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em diferentes concentrações de sacarose; A) - em relação à porcentagem de calos embriogênicos; B) - em relação à qualidade dos calos embriogênicos; C) - em relação ao número de plantas regeneradas.



Os aumentos da qualidade dos calos embriogênicos e do número de plantas regeneradas das variedades RB92579 e RB99395, em função das concentrações de sacarose aplicadas no meio de cultivo, foram melhor explicados pelas equações de 1º grau (Figura 6).

Figura 6. Análises de regressão mostrando os efeitos das concentrações de sacarose sobre as variedades RB92579 e RB99395, no processo de embriogênese somática; A) - em relação à qualidade dos calos embriogênicos; B) – em relação ao número de plantas regeneradas.



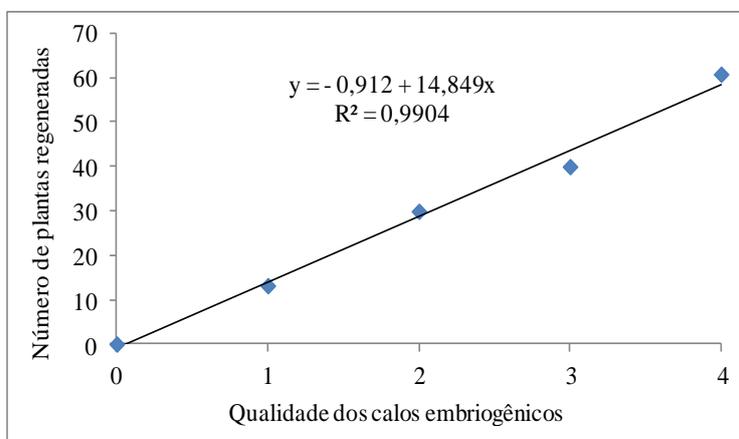
As duas variáveis analisadas apresentaram comportamentos semelhantes, em ambas observou-se que as maiores concentrações de sacarose (30 e 40 g L⁻¹), durante a fase de indução e maturação de calos, promoveram os melhores resultados. Entretanto, as regressões mostraram que a partir da concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose o aumento na qualidade dos calos e no número de plantas regeneradas já não foi tão expressivo. A relação custo/ benefício foi maior na concentração de 30 g L⁻¹, ou seja, foi a mais viável neste estudo. Provavelmente, concentrações superiores a 40 g L⁻¹ iriam causar efeitos

decrecentes no desenvolvimento dos explantes dessas variedades. Altas concentrações de sacarose reduzem o potencial osmótico do meio de cultura, podendo dificultar a absorção dos nutrientes.

Por outro lado, Tapia et al. (1999) estudando calos embriogênicos da variedade Cp 5243 de cana-de-açúcar demonstraram que os meios de cultura enriquecidos com 60 g L⁻¹ de sacarose e 1 mg L⁻¹ de ANA promoveram melhores resultados nos processos de indução e maturação dos embriões somáticos. Essa variação entre os trabalhos pode ter ocorrido em função dos genótipos utilizados em cada um deles.

Houve correlação alta e positiva entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas, ou seja, quanto melhor foi a qualidade dos calos embriogênicos maior foi o número de plantas formadas na fase clara (Figura 7).

Figura 7. Equação de 1º grau mostrando a correlação existente entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas.



CONCLUSÕES

A porcentagem de calos embriogênicos formados, a qualidade desses calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas a partir dos embriões somáticos são características inerentes a cada variedade.

A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura é indicada como a mais viável para as variedades estudadas no desenvolvimento de calos embriogênicos na fase escura.

O escurecimento dos explantes, devido a exsudação dos compostos fenólicos, pode ser controlado com o reposicionamento frequente dos mesmos até a formação de calos embriogênicos.

Há uma correlação alta e positiva entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas para as variedades RB92579 e RB99395 de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRATO, P. V.; STEWARD, F. C. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. **Botanical Gazette**, v. 132, n. 2, p. 149-158, 1971.

BUTTON, J. The effect of some carbohydrates on the growth and organization of citrus ovular callus. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.88, p.61-68, 1978.

CIDADE, D. A. P.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NOVOA, A. V.; LINARES, A. F.; LAJOLO, F. M.; GEVONESE, M. I. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 61, n. 4, p. 187-192, 2006.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

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

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

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 371-393.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, 2006.

LITZ, R. E.; JARRET, R. L. Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos, embriogênese somática y organogênese. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991, p. 143-172.

LU, C.; VASIL, I. K.; OZIAS-AKINS, P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 62, n. 2, p. 109-112, 1982.

MACEDO, A. F. **Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PAYET, B.; SING, A. S. C.; SMADJA, J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 26, p. 10074–10079, 2005.

SALAJOVA, T.; SALAJ, J.; KORMUTAK, A. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. **Plant Science**, v. 145, n. 1, p. 33-40, 1999.

SANTANA, G. F.; SALAZAR, R. V.; MATA, J. Efecto de la fuente de carbono sobre la organogênese y embriogênese somática em cacao. Análisis citogenético. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 60, n. 2, p. 193-202, 2010.

TAPIA, R.; CASTILLO, R.; NIEVES, N.; BLANCO, M. A.; GONZÁLEZ, J. L.; SÁNCHEZ, M.; RODRÍGUEZ, Y. Inducción, maduración y encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum Sp.*) var Cp 5243. **Biotecnología Aplicada**. v. 16, n. 1, p. 20-23, 1999.

TEIXEIRA, J.B., MARBACH, P.A.S.; SANTOS, M. de O. **Otimização da metodologia da embriogênese somática visando à propagação clonal de genótipos elite de cacao (*Theobroma cacao* L.)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2002, Documentos, 79, 34p.

TORRES, A.C.; DUVAL, F.G.; RIBEIRO, D.G.; BARROS, A.F.F.; ARAGÃO, F.A.D. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata* in vitro. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.789-792, 2005.

CAPÍTULO 2

Efeito do 2,4-D na embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar

RESUMO

A embriogênese somática é uma ferramenta que pode auxiliar nos estudos básicos de fisiologia e bioquímica, transformação genética, fusão de protoplastos e propagação clonal da cana-de-açúcar. As auxinas sintéticas ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftaleno acético (ANA), picloram e dicamba são reguladores de crescimento bastante utilizados nesse processo. Entre esses, o 2,4-D é o mais utilizado na indução à embriogênese somática de cana-de-açúcar. Concentrações inadequadas desse regulador de crescimento podem limitar a formação dos calos embriogênicos e, conseqüentemente, de embriões. Este trabalho teve por objetivo determinar as melhores concentrações de 2,4-D no processo de embriogênese somática para as variedades RB92579 e RB99395 de cana-de-açúcar. Ápices caulinares, com 8 a 10 meses de idade, foram coletados e levados para o laboratório, onde foram higienizados e dissecados até a obtenção do meristema apical envolvido por primórdios foliares. Os explantes foram colocados em meios de cultura MS compostos por quatro concentrações de 2,4-D: 0, 3, 6 e 9 mg L⁻¹. A porcentagem de calos embriogênicos e a qualidade dos calos embriogênicos foram avaliadas após oito semanas no escuro; e o número de plantas regeneradas, após sete semanas no claro. Os explantes cultivados sem 2,4-D ficaram marrons, não formaram calos e morreram após a terceira semana de cultivo. As concentrações de 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, utilizadas nos meios de cultura MS, foram as mais viáveis para as variedades RB92579 e RB99395 na formação e qualidade dos calos embriogênicos, assim como, no número de plantas regeneradas.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, regulador de crescimento, calos embriogênicos.

Effect of 2,4-D in indirect somatic embryogenesis of two RB varieties of sugarcane**ABSTRACT**

Somatic embryogenesis is a tool that can help with basic studies of physiology and biochemistry, genetic transformation, protoplast fusion and clonal propagation of sugar cane. The synthetic auxin 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), naphthalene acetic acid (NAA), picloram and dicamba are growth regulators widely used in this process. Among these, 2,4-D is the most used in the induction of somatic embryogenesis of sugar cane. Inadequate concentrations of this growth regulator may limit the formation of embryogenic callus and, consequently, of embryos to be formed. This study aimed to determine the best concentrations of 2,4-D on somatic embryogenesis process for the varieties RB92579 and RB99395 of cane sugar. Soft-end stems of 8-10 months-old plants were collected in the field and taken to the laboratory where they were cleaned and dissected to obtain the apical meristem surrounded by few leaves primordia. The explants were placed in MS culture media containing four concentrations of 2,4-D: 0, 3, 6 and 9 mg L⁻¹. The percentage and the quality of the embryogenic calli were evaluated after eight weeks in the dark; and the number of regenerated plants was evaluated after seven weeks in a 16 hour photoperiod. The explants cultured without 2,4-D were brown, did not present callus and died after the third week of cultivation. The concentration of 3 mg L⁻¹ of 2,4-D added to the culture medium was designated as the best treatment to formation and quality of embryogenic calli, as well as the number of regenerated plants in both varieties.

Keywords: *Saccharum officinarum*, growth regulator, embryogenic calli.

INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é uma ferramenta biotecnológica que pode ser utilizada em inúmeras situações nos programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar. Essa técnica pode auxiliar nos estudos básicos de fisiologia e bioquímica, transformação genética, fusão de protoplastos e propagação clonal (PRAKASH e VARADARAJAN, 1992; YEUNG, 1995; STEINER et al., 2008).

O sucesso dessa técnica depende do controle de muitas variáveis, como espécie, estado fisiológico e idade da planta matriz, nutrientes e reguladores de crescimento do meio nutritivo (JIMÉNEZ, 2005). As auxinas sintéticas: ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftaleno acético (ANA), picloram e dicamba são reguladores de crescimento bastante utilizados nos processos embriogênicos.

Segundo Jiménez (2005), o 2,4-D é a auxina mais utilizada na indução à embriogênese somática de muitas espécies. Altas concentrações dessa auxina alteram, rapidamente, o metabolismo das células dos explantes, resultando no desenvolvimento de calos (DUDITS et al., 1995).

Vários autores têm demonstrado o efeito positivo do 2,4-D na indução de calos e embriogênese somática de cana-de-açúcar (TIEL et al., 2006; SANI e MUSTAPHA, 2010). Nesses estudos tem-se observado variações na recomendação da melhor concentração de 2,4-D a ser utilizada em função do genótipo estudado.

Concentrações inadequadas dessa auxina podem limitar o desenvolvimento dos explantes na formação dos calos embriogênicos. Sendo assim, tornam-se necessários novos estudos para determinação da concentração ótima desse regulador de crescimento para cada genótipo de cana estudado.

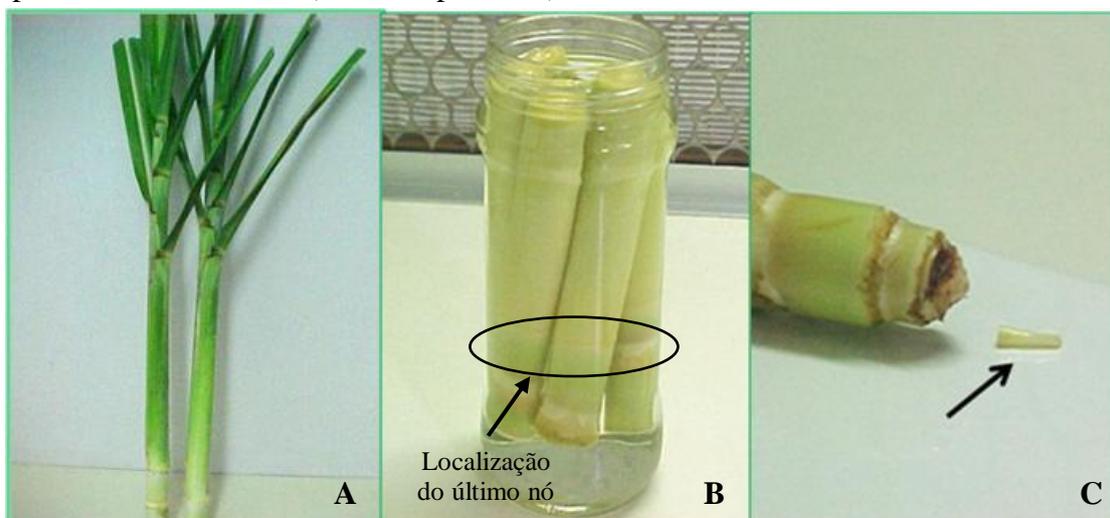
O presente trabalho teve por objetivo determinar as melhores concentrações de 2,4-D no processo de embriogênese somática para as variedades RB92579 e RB99395, utilizadas no Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar do CECA-UFAL.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ápices caulinares de cana-de-açúcar das variedades RB92579 e RB99395, com 8 a 10 meses de idade (Figura 1A), foram coletados em área experimental do Centro de Ciências Agrárias (CECA/UFAL), localizado na BR 104 Norte, Km 85, Rio Largo – AL e em seguida levados para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BIOVEG), do CECA, onde o experimento foi realizado.

No BIOVEG, os ápices foram reduzidos até a obtenção do palmito, isto é, um conjunto de folhas jovens enroladas concentricamente no ápice caulinar das plantas. Os palmitos, com cerca de 15 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, contendo o último nó sobre o qual está localizado o meristema apical (Figura 1B), foram inicialmente lavados em água corrente e enxaguados em água destilada. Na câmara de fluxo laminar, foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 0,66% (v/v) por 20 minutos e enxaguados com água destilada estéril por três vezes. Sobre ladrilhos autoclavados, os palmitos foram excisados individualmente, utilizando-se pinça e bisturi, até a obtenção do meristema apical envolvido por alguns primórdios foliares (Figura 1C).

Figura 1. Processo de coleta, limpeza e excisão dos explantes para introdução à técnica da embriogênese somática. A) – Ápices caulinares coletados de canas com 8 a 10 meses de idade; B) – Palmitos extraídos dos ápices caulinares e tratados em solução de hipoclorito de sódio a 0,66% (v/v); C) – Excisão do meristema apical envolvido por primórdios foliares com aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro (indicado pela seta). Fotos: Marcondes Inácio da Silva.



Os explantes, com aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro, foram introduzidos, horizontalmente, em frascos de vidros (10 x 8 cm) contendo 30 mL de meio de cultura, composto pelos sais e vitaminas MS

(MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 50 mg L⁻¹ de arginina, 30 g L⁻¹ de sacarose e 50 mL L⁻¹ de água de coco, no qual foram testadas quatro concentrações de 2,4-D: 0, 3, 6 e 9 mg L⁻¹. Todos os meios de cultura foram gelificados com 2,5 g L⁻¹ de gelrite, autoclavados a 121 °C e a 1 atm por 20 minutos com pH previamente ajustado em 5,8. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 (2 variedades x 4 concentrações de 2,4-D) com 3 repetições. Cada parcela foi composta por seis frascos contendo um explante em cada um.

Para a indução de calos embriogênicos, os explantes foram mantidos no escuro sob temperatura de 25 ± 1 °C em estufa de crescimento (tipo BOD), durante oito semanas, sendo que, nas últimas três semanas, os explantes de todos os tratamentos foram transferidos para meio de cultura com 0,25 mg L⁻¹ de 2,4-D, mantidos os demais reagentes e as suas respectivas concentrações, para a maturação dos embriões.

Para impedir que a oxidação dos explantes, provocada pela exsudação dos compostos fenólicos, avançasse para todo o meio de cultura e provocasse maior nocividade ao desenvolvimento dos calos, a cada quatro dias, até os primeiros 20 dias de cultivo, os explantes eram reposicionados dentro dos frascos de cultura, de modo que os explantes permanecessem em áreas “limpas” do meio de cultura.

Após as oito semanas nos meios de indução à embriogênese somática, os calos embriogênicos foram transferidos para meio de cultura MS enriquecido com 0,1 mg L⁻¹ de cinetina, 0,2 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 30 g L⁻¹ de sacarose, sob temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 50 μmol/m² s⁻¹, durante três semanas para a germinação dos embriões somáticos. Em seguida, as culturas foram transferidas para meio MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de Ácido Giberélico (GA₃) e 30 g L⁻¹ de sacarose, mantidas as condições de temperatura e luminosidade, onde permaneceram por mais quatro semanas para o crescimento das plantas.

A porcentagem de calos embriogênicos e a qualidade dos calos embriogênicos foram avaliadas no final da fase escura; o número de plantas regeneradas a partir dos embriões somáticos, após a fase clara. Para a avaliação da qualidade dos calos embriogênicos foi desenvolvida uma escala de notas variando de 0 a 4 (Figura 2).

Figura 2. Escala de notas desenvolvida para avaliar a qualidade dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar, após oito semanas de cultivo no escuro. Fotos: Marcondes Inácio da Silva

Notas	Características
 <p>0</p>	Tecido vegetal sem alterações ou calos não embriogênicos
 <p>1</p>	Menos de 25% da área do explante ocupada por massa embriogênica
 <p>2</p>	Entre 25 e 50% da área do explante ocupada por massa embriogênica
 <p>3</p>	Entre 50 e 75% da área do explante ocupada por massa embriogênica
 <p>4</p>	Mais de 75% da área do explante ocupada por massa embriogênica

Os dados obtidos das variáveis foram avaliados estatisticamente por meio de análise de variância e ajustados a curvas de regressão. Os dados das notas relativas às qualidades dos calos embriogênicos foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$, os demais dados não foram transformados. Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

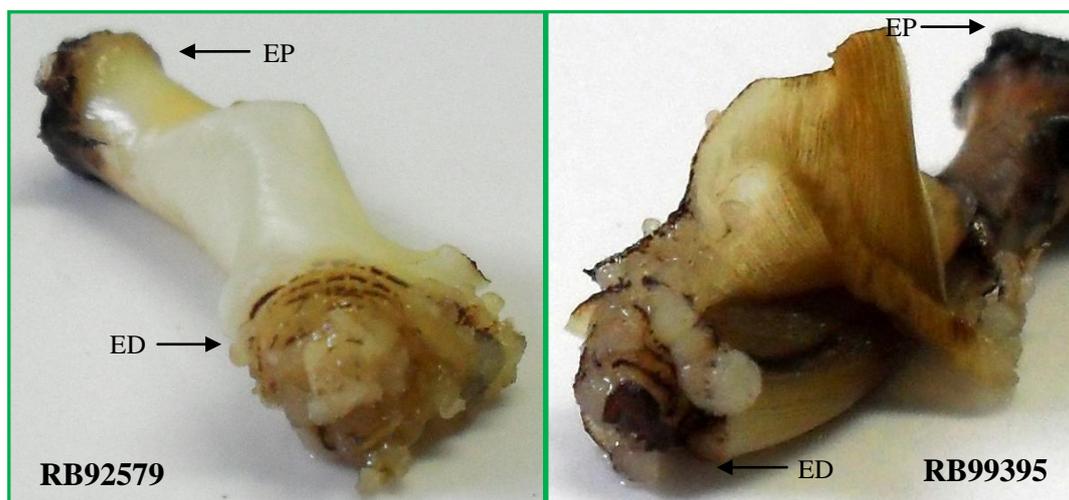
Nas primeiras semanas da indução de calos, observou-se uma intensa oxidação nos explantes, provavelmente pelo fato dessa espécie apresentar teores elevados de compostos fenólicos nos seus tecidos (PAYET et al., 2005; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Os fenóis, exsudados pelas células lesionadas, quando entram em contato com o oxigênio, sofrem reações de oxidação e resultam em produtos tóxicos, ocasionando o escurecimento e a necrose dos explantes (RODRIGUES, 2003). Esses fenóis interferem negativamente na formação de calos, principalmente nas primeiras três semanas. Beruto et al. (1996) constataram que a não regeneração de calos em *Ranunculus asiaticus* L. foi devido ao alto índice de polímeros fenólicos; semelhantemente, estudos de embriogênese somática em diferentes genótipos de cacau realizados por Santana et al. (2010) mostraram que grande parte dos explantes necrosados não formaram calo, provavelmente pelo efeito inibitório apresentado pelos compostos fenólicos no crescimento de tecidos.

Todavia, o efeito prejudicial dos fenóis, neste trabalho, foi minimizado quando os explantes foram reposicionados a cada quatro dias, até o 20º dia, dentro dos frascos de cultura, de forma que a oxidação da área lesionada não abrangesse todo o meio de cultura e assim os explantes permanecessem em áreas “limpas” do meio.

Observou-se que a grande maioria dos explantes iniciou o processo de intumescimento e proliferação das células a partir da segunda semana de cultivo. As extremidades dos explantes, principalmente a distal, são as áreas onde o desenvolvimento dos calos é desencadeado, ou seja, áreas onde as células sofrem o ferimento durante a excisão (Figura 3).

A massa de calos aumentou significativamente entre a terceira e quinta semana de cultivo, provavelmente pela redução da exsudação dos fenóis neste período. Lorenzo et al. (2001), estudando a micropropagação de cana-de-açúcar, constataram que os explantes meristemáticos exsudavam compostos fenólicos intensamente até os 20 dias iniciais de cultivo. Sugere-se que os fenóis limitam o desenvolvimento dos calos nesse período.

Figura 3. Intumescimento e proliferação de células nas extremidades (distal - ED e proximal - EP) de explantes meristemáticos de cana-de-açúcar após 15 dias de cultivo em meio de cultura indutor de embriogênese somática com 3 mg L^{-1} de 2,4-D. Fotos: Marcondes Inácio da Silva.



Os explantes cultivados sem 2,4-D ficaram marrons, não formaram calos e morreram após a terceira semana de cultivo (Figura 4), resultados semelhantes foram relatados por Sani e Mustapha (2010) estudando calogênese em explantes de cana-de-açúcar. Por outro lado, todos os outros tratamentos apresentaram alta formação de calos embriogênicos. Segundo Tiel et al. (2006) concentrações baixas de 2,4-D induzem a formação de calos embriogênicos em cana-de-açúcar.

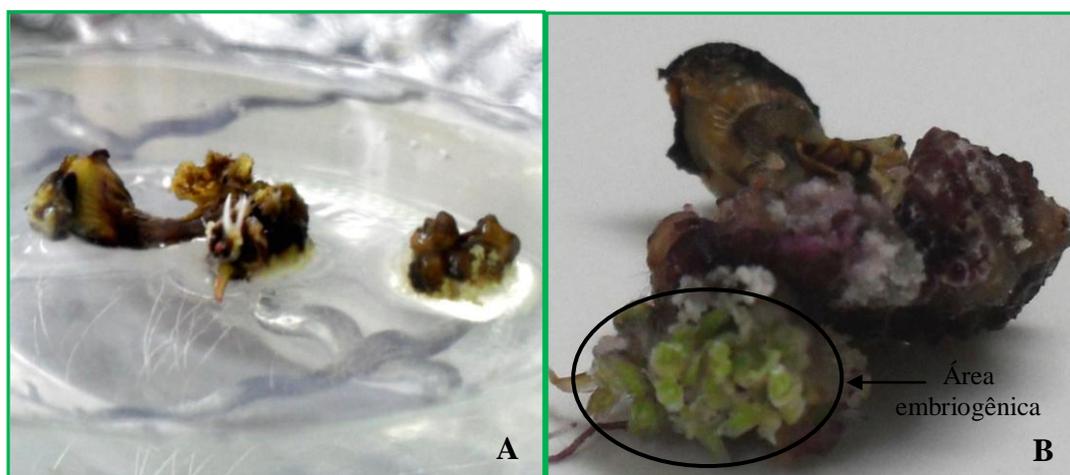
Figura 4. Escurecimento e morte dos tecidos de explante de cana-de-açúcar após 20 dias de cultivo em meio de cultura de indução à embriogênese somática sem 2,4-D. Foto: Marcondes Inácio da Silva.



Todos os calos embriogênicos regeneraram plantas quando foram colocados na presença de luz (fotoperíodo de 16 horas). O aparecimento de pigmentos esverdeados,

logo na primeira semana de cultivo, foram indícios da germinação dos embriões somáticos. Por outro lado, os calos não embriogênicos não formaram plantas nas mesmas condições dadas, esses calos necrosaram ou apresentaram pigmentos antociânicos (Figura 5). Gill et al. (2004) e Macedo (2010) verificaram esse mesmo fato estudando culturas não embriogênicas de cana-de-açúcar. Alguns calos obtidos apresentaram áreas embriogênicas e não embriogênicas, esses calos foram classificados por Gandonou et al. (2005) como um tipo intermediário, e quando foram transferidos para o claro regeneraram plantas apenas nas áreas embriogênicas (Figura 5B).

Figura 5. Calos não embriogênico (CNE) e intermediário (CI) após três semanas de cultivo em fotoperíodo de 16 horas e meio de cultura de germinação de embriões somáticos. A) – CNE necrosado; B) - CI com regeneração de plantas na área embriogênica e pigmentos antociânicos na área não embriogênica. Fotos: Marcondes Inácio da Silva.



De acordo com o teste F da análise de variância (Tabela 1), a interação entre as variedades de cana-de-açúcar e as concentrações de 2,4-D adicionadas ao meio de cultura indutor de embriogênese somática não teve efeito significativo para a porcentagem de calos embriogênicos, indicando que, em relação a essa variável, esses dois fatores são independentes e, portanto, devem ser analisados separadamente. Entretanto, em relação à qualidade dos calos embriogênicos e ao número de plantas regeneradas, as interações foram significativas, com $p < 0,036$ e $p < 0,002$, respectivamente, requerendo o desdobramento da ANAVA para estudo dessas variáveis.

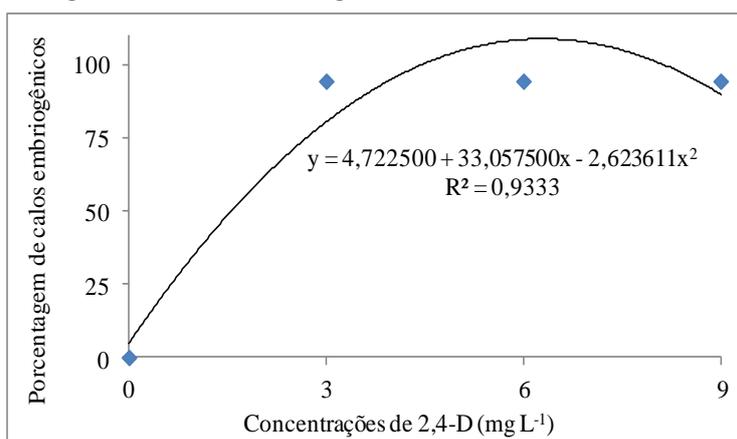
Tabela 1. Resumo da análise de variância para a porcentagem de calos embriogênicos, qualidade dos calos embriogênicos e número de plantas regeneradas.

Causa de variação	GL	Quadrados médios e (Probabilidades)		
		Porcentagem de CE	Qualidade dos CE	Nº de plantas regeneradas
Variedades (F1)	1	46,2038 ^{ns}	0,3309 (p<0,001)	1204,1664 (p<0,001)
Concent. de 2,4-D (F2)	(3)	13381,2038 (p<0,001)	1,1764 (p<0,001)	2049,6790 (p<0,001)
Reg. Linear	1	24086,1668 (p<0,001)	-----	-----
Reg. Quadrática	1	13381,2038 (p<0,001)	-----	-----
Desvio de regressão	1	2676,2408 (p<0,001)	-----	-----
Interação F1 x F2	3	169,4138 ^{ns}	0,0478 (p<0,036)	217,1049 (p<0,002)
Tratamentos	7	5814,0080 (p<0,001)	0,5719 (p<0,001)	1143,5026 (p<0,001)
Resíduo	16	138,6112	0,0131	27,3981
Total	23			
CV (%)		16,62	8,37	20,94

NOTA: (ns) - não significativo: p>0,05.

Em relação à porcentagem de calos embriogênicos, as variedades RB92579 e RB99395 não diferiram estatisticamente, pelo teste F, em função das concentrações de 2,4-D aplicadas no meio de indução à embriogênese somática, indicando que as duas variedades tiveram resultados muito próximos. Por outro lado, as regressões linear e quadrática e o desvio de regressão tiveram efeitos altamente significativos (p<0,001). Contudo, o modelo quadrático foi o que melhor explicou o comportamento dessa variável sobre as variedades RB92579 e RB99395 em função das concentrações de 2,4-D utilizadas (Figura 6).

Os aumentos de concentrações desse regulador de crescimento, entre 3 e 9 mg L⁻¹, não proporcionaram acréscimos no percentual de calos embriogênicos formados. Houve uma estabilização dos resultados nessas concentrações, indicando, obviamente, que a concentração de 3 mg L⁻¹ de 2,4-D foi a mais viável, economicamente, para essa variável (Figura 6).

Figura 6. Análise de regressão mostrando os efeitos das concentrações de 2,4-D sobre as variedades RB92579 e RB99395, no processo de embriogênese somática em relação à porcentagem de calos embriogênicos.

Em relação à qualidade dos calos embriogênicos e ao número de plantas regeneradas, as concentrações de 2,4-D utilizadas tanto na variedade RB92579 como na RB99395, na indução da embriogênese somática, tiveram modelos de regressão (linear e quadrático) e desvio de regressão, significativos de acordo com o teste F (Tabela 2). Os modelos quadráticos foram os que melhor explicaram os efeitos das concentrações de 2,4-D sobre cada variedade estudada tanto para a qualidade dos calos embriogênicos como para o número de plantas regeneradas (Figura 7).

Tabela 2. Desdobramento da análise de variância para a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas.

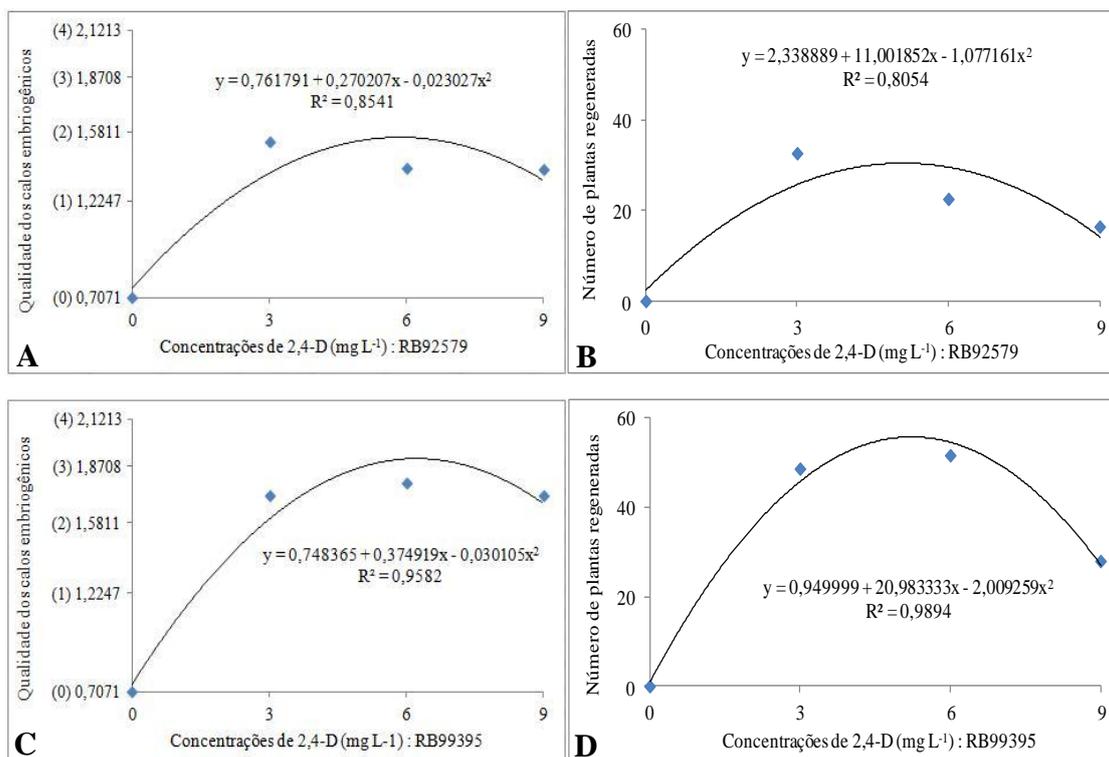
Causa de variação	GL	Quadrados médios e (Probabilidades)	
		Qualidade dos CE	Nº de plantas regeneradas
Variedades	1	0,3309 (p<0,001)	1204,1664 (p<0,001)
Concentrações de 2,4-D : RB92579	(3)	0,4100 (p<0,001)	562,2562 (p<0,001)
Reg. linear (conc. 2,4-D : RB92579)	1	0,5352 (p<0,001)	230,7574 (p<0,010)
Reg. quadrática (conc. 2,4-D : RB92579)	1	0,5154 (p<0,001)	1127,7872 (p<0,001)
Desvio de reg. (conc. 2,4-D : RB92579)	1	0,1794 (p<0,002)	328,2240 (p<0,003)
Concentrações de 2,4-D : RB99395	(3)	0,8142 (p<0,001)	1704,5277 (p<0,001)
Reg. linear (conc. 2,4-D : RB99395)	1	1,4595 (p<0,001)	1135,3498 (p<0,001)
Reg. quadrática (conc. 2,4-D : RB99395)	1	0,8809 (p<0,001)	3924,0833 (p<0,001)
Desvio de reg. (conc. 2,4-D : RB99395)	1	0,1021 (p<0,013)	54,1499 ^{ns}
Resíduo	16	0,0131	27,3981

Nota: (ns) – não significativo: p>0,05.

A concentração de 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, utilizada na variedade RB92579 na indução da embriogênese somática, promoveu os melhores resultados de qualidade dos calos embriogênicos e número de plantas regeneradas, sendo a mais viável para essa variedade (Figura 7AB). Em relação à variedade RB99395, a concentração de 6 mg L⁻¹ de 2,4-D induziu resultados tecnicamente superiores às demais concentrações, no entanto, do ponto de vista econômico, a concentração de 3 mg L⁻¹, também, foi a mais viável para a qualidade dos calos embriogênicos e número de plantas regeneradas da variedade RB99395 por apresentar uma menor relação custo/ benefício (Figura 7CD).

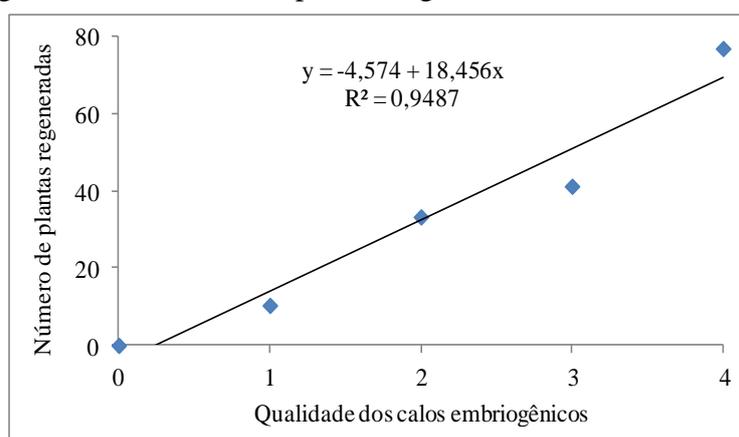
Resultados semelhantes foram obtidos por Sani e Mustapha (2010) que, estudando a embriogênese somática em genótipos de cana-de-açúcar verificaram que a produção de calos embriogênicos foi significativamente superior quando os meios de cultura foram suplementados com 2,5 e 3 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Figura 7. Análises de regressão mostrando os efeitos das concentrações de 2,4-D sobre cada variedade estudada, no processo de embriogênese somática, para a qualidade dos calos embriogênicos e para o número de plantas regeneradas.



Os resultados apresentados demonstraram que houve correlação alta e positiva entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas, isto é, os calos embriogênicos com notas superiores originaram maior número de plantas quando submetidos à fase clara (Figura 8).

Figura 8. Equação de 1º grau mostrando a correlação existente entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas.



CONCLUSÕES

As concentrações de 3 mg L^{-1} de 2,4-D, utilizadas nos meios de cultura MS, são mais viáveis para as variedades RB92579 e RB99395 na formação e qualidade dos calos embriogênicos, assim como, no número de plantas regeneradas a partir dos embriões somáticos.

A ausência do 2,4-D nos meios de cultura MS não induz a formação de calos embriogênicos.

O escurecimento dos explantes, devido a exsudação dos compostos fenólicos, pode ser controlado com o reposicionamento frequente dos mesmos até a formação de calos embriogênicos.

Há uma correlação alta e positiva entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas para as variedades RB92579 e RB99395 de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERUTO, M.; CURIR, P.; DEBERGH, P. Callus growth and somatic embryogenesis in thalamus tissue of *Ranunculus asiaticus* L. cultivated *in vitro*: Cytokinin effect and phenol metabolism. ***In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant***, v. 32, n. 3, p. 154-160, 1996.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NOVOA, A. V.; LINARES, A. F.; LAJOLO, F. M.; GEVONESE, M. I. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) juice. ***Plant Foods for Human Nutrition***. v. 61, n. 4, p. 187-192, 2006.
- DUDITS, D.; GYÖRGYÉY, J.; BÖGRE, L.; BAKÓ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). ***In vitro embryogenesis in plants***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, cap. 8, p. 267-308.
- GANDONOU, C.; ERRABII, T.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; CHIBI, F.; SENHAJI, N. S. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). ***African Journal of Biotechnology***, v. 4, n. 11, p. 1250-1255, 2005.
- GILL, N. K.; GILL, R.; GOSAL, S. S. Factors enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) ***Indian Journal of Biotechnology***, v. 3, n. 1, p. 119-123, 2004.
- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. ***Plant Growth Regulation***, v. 47, n. 2-3, p. 91-110, 2005.
- LORENZO, J. C.; BLANCO, M. A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2001.
- MACEDO, A. F. **Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiology Plantarum***, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PAYET, B.; SING, A. S. C.; SMADJA, J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 10074–10079, 2005.

PRAKASH, C. S., VARADARAJAN, U. Genetic transformation of sweetpotato. In: HILL, W. A.; BONSI, C. K.; LORETAN, P. A. (Ed). **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee University. 1992, p. 27-37.

RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. L.; FACHINELLO, J. C.; SILVA, J. B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus sp.* em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2003.

SANI, L. A.; MUSTAPHA, Y. Effect of genotype and 2,4-D concentration on callogenesis in sugarcane (*Saccharum spp.* Hybrids). **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, Kano, v. 3, n. 1, p. 238-240, 2010.

SANTANA, G. F.; SALAZAR, R. V.; MATA, J. Efecto de la fuente de carbono sobre la organogénesis y embriogénesis somática em cacao. Análisis citogenético. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 60, n. 2, p. 193-202, 2010.

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

TIEL, K.; ENRÍQUEZ, G. A.; CEBALLO, Y.; SOTO, N.; FUENTES, A. D.; FERREIRA, A.; COLL, Y.; PUJOL, M. Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. **Biotecnología Aplicada**, v. 23, n. 1, p. 22-24, 2006.

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

CAPÍTULO 3

Efeito do carvão ativado na embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar

RESUMO

O carvão ativado, quando utilizado em culturas de calos embriogênicos, adsorve substâncias inibitórias como reguladores de crescimento residuais, compostos fenólicos presentes nos explantes, etileno, entre outras substâncias, potencializando as respostas de maturação dos embriões somáticos. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do carvão ativado na maturação dos embriões somáticos das variedades RB92579 e RB99395 de cana-de-açúcar. Ápices caulinares, com 8 a 10 meses de idade, foram coletados e levados para o laboratório, onde foram higienizados e dissecados até a obtenção do meristema apical envolvido por primórdios foliares. Os explantes foram introduzidos em meio de cultura, indutor de calos, onde permaneceram por cinco semanas no escuro. Os calos formados foram submetidos a quatro tratamentos com carvão ativado (0; 0,75; 1,50 e 2,25 g L⁻¹), onde permaneceram por mais três semanas, no escuro, para a maturação dos embriões. A porcentagem de calos embriogênicos e a qualidade dos calos embriogênicos foram avaliadas após as oito semanas no escuro; e o número de plantas regeneradas, após sete semanas subsequentes no claro. O carvão ativado estimulou a germinação precoce parcial dos embriões ainda no escuro causando o aparecimento apenas das raízes sobre os calos. A qualidade dos calos embriogênicos da variedade RB99395 foi superior a da variedade RB92579, mas essa diferença não influenciou significativamente o número de plantas regeneradas. De uma maneira geral, os aumentos das concentrações de carvão ativado, reduziram a porcentagem de calos embriogênicos, a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas nas duas variedades.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, compostos fenólicos, culturas embriogênicas.

Effect of activated charcoal in indirect somatic embryogenesis of two RB varieties of sugarcane

ABSTRACT

Activated charcoal, when used in callus cultures can adsorb inhibitory substances as growth regulators and residual phenolic compounds present in the explants, among other substances, enhancing the responses of maturation of somatic embryos. This study aimed to evaluate the effect of activated charcoal in the maturation of somatic embryos of the varieties RB92579 and RB99395 of sugar cane. Soft-end stems of 8-10 months-old plants were collected and taken to the lab where they were cleaned and dissected to obtain the apical meristem surrounded by few leaves primordia. The explants were placed in a culture medium for callus induction in the dark where remained for five weeks. The calli formed in the first five weeks were subjected to four treatments with activated charcoal (0; 0,75; 1,50 and 2,25 g L⁻¹), where they remained for more three weeks in the dark for the maturation of embryos. The quality of the embryogenic and non-embryogenic calli and the number of formed embryos were evaluated after eight weeks in the dark; and the number of regenerated plants after seven weeks in 16 hours photoperiod. The activated charcoal reduced the phenolic compounds in the culture media. The activated charcoal stimulated the early partial germination of the somatic embryo, causing the appearance of roots in the callus. The quality of the somatic embryos produced by the variety RB99395 was superior to the RB92579, but this difference did not significantly affect the number of regenerated plants. The use of activated charcoal reduced the percentage and the quality of embryogenic calli and the number of regenerated plants in both varieties.

Keywords: *Saccharum officinarum*, phenolic compounds, embryogenic cultures.

INTRODUÇÃO

O carvão ativado tem inúmeras aplicações na cultura de tecidos, principalmente nos processos de organogênese e embriogênese somática das plantas, no entanto, a adição inadequada dessa substância aos meios de cultivo pode produzir efeitos prejudiciais às culturas *in vitro* (PAN e STADEN, 1998).

A embriogênese somática indireta é compreendida em duas etapas: a primeira é uma fase de indução de calos em meio de cultura contendo teores elevados de uma auxina e a outra, uma fase de maturação dos embriões somáticos em meio de cultura contendo baixa concentração de auxina e/ou um agente maturador tal qual o carvão ativado, o polietilenoglicol, o ácido abscísico, entre outros (STEINER et al., 2008).

Diversos autores têm utilizado o carvão ativado nos processos embriogênicos em várias espécies de importância econômica, como soja (BUCHHEIM et al., 1989), cacau (VENTURIERI e VENTURIERI, 2004), *Piscea abies* (PULLMAN et al., 2005), cana-de-açúcar (MACEDO, 2010), entre outras.

Esse elemento, quando utilizado em culturas *in vitro*, adsorve substâncias inibitórias como reguladores de crescimento residuais, compostos fenólicos presentes nos explantes, etileno, entre outras substâncias, potencializando as respostas de maturação dos embriões somáticos (MACEDO, 2010).

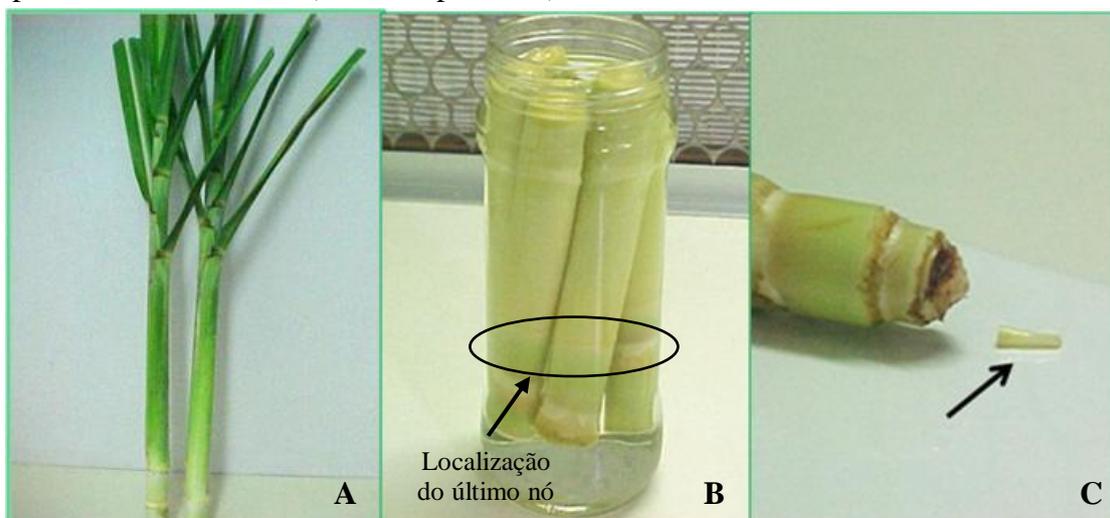
Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do carvão ativado na produção e maturação de embriões somáticos das variedades de cana-de-açúcar RB92579 e RB99395 utilizadas no Programa de Melhoramento Genético da Universidade Federal de Alagoas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ápices caulinares de cana-de-açúcar das variedades RB92579 e RB99395, com 8 a 10 meses de idade (Figura 1A), foram coletados em área experimental do Centro de Ciências Agrárias (CECA/UFAL), localizado na BR 104 Norte, Km 85, Rio Largo – AL e em seguida levados para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BIOVEG), do CECA, onde o experimento foi realizado.

No BIOVEG, os ápices foram reduzidos até a obtenção do palmito, isto é, um conjunto de folhas jovens enroladas concentricamente no ápice caulinar das plantas. Os palmitos, com cerca de 15 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, contendo o último nó sobre o qual está localizado o meristema apical (Figura 1B), foram inicialmente lavados em água corrente e enxaguados em água destilada. Na câmara de fluxo laminar, foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 0,66% (v/v) por 20 minutos e enxaguados com água destilada estéril por três vezes. Sobre ladrilhos autoclavados, os palmitos foram excisados individualmente, utilizando-se pinça e bisturi, até a obtenção do meristema apical envolvido por alguns primórdios foliares (Figura 1C).

Figura 1. Processo de coleta, limpeza e excisão dos explantes para introdução à técnica da embriogênese somática. A) – Ápices caulinares coletados de canas com 8 a 10 meses de idade; B) – Palmitos extraídos dos ápices caulinares e tratados em solução de hipoclorito de sódio a 0,66% (v/v); C) – Excisão do meristema apical envolvido por primórdios foliares com aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro (indicado pela seta). Fotos: Marcondes Inácio da Silva.



Os explantes, com aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro, foram introduzidos, horizontalmente, em frascos de vidros (10 x 8 cm) contendo 30 mL de meio de cultura, composto pelos sais e vitaminas MS

(MURASHIGE e SKOOG, 1962), 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, 50 mg L⁻¹ de arginina, 30 g L⁻¹ de sacarose e 50 mL L⁻¹ de água de coco, onde permaneceram por cinco semanas.

Após esse período de indução de calos, as culturas foram transferidas para meios de cultivo compostos dos sais e vitaminas MS, arginina, sacarose, água de coco (nas mesmas concentrações anteriores) e 0,25 mg L⁻¹ de 2,4-D, onde permaneceram por mais três semanas; nesse meio foram adicionadas quatro concentrações de carvão ativado: 0; 0,75; 1,50 e 2,25 g L⁻¹ para estudo da maturação dos embriões.

Durante essas oito semanas de cultivo, o material permaneceu no escuro, sob temperatura de 25 ± 1 °C em estufa de crescimento (tipo BOD). Todos os meios de cultura foram gelificados com 2,5 g L⁻¹ de gelrite e autoclavados a 121 °C e a 1 atm por 20 minutos com pH previamente ajustado em 5,8. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 (2 variedades x 4 concentrações de carvão ativado) com 3 repetições. Cada parcela foi composta por seis frascos contendo um explante em cada um.

Para impedir que a oxidação dos explantes, provocada pela exsudação dos compostos fenólicos, avançasse para todo o meio de cultura e provocasse maior nocividade ao desenvolvimento dos calos, a cada quatro dias, até os primeiros 20 dias de cultivo, os explantes eram reposicionados dentro dos frascos de cultura, de modo que os explantes permanecessem em áreas “limpas” do meio de cultura.

Após as oito semanas nos meios de indução à embriogênese somática, os calos embriogênicos foram transferidos para meio de cultura MS enriquecido com 0,1 mg L⁻¹ de cinetina, 0,2 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 30 g L⁻¹ de sacarose, sob temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 50 μmol/m² s⁻¹, durante três semanas para a germinação dos embriões somáticos. Em seguida, as culturas foram transferidas para meio MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de Ácido Giberélico (GA₃) e 30 g L⁻¹ de sacarose, mantidas as condições de temperatura e luminosidade, onde permaneceram por mais quatro semanas para o crescimento das plantas.

A porcentagem de calos embriogênicos e a qualidade dos calos embriogênicos foram avaliadas no final da fase escura; o número de plantas regeneradas a partir dos embriões somáticos, após a fase clara. Para a avaliação da qualidade dos calos embriogênicos foi desenvolvida uma escala de notas variando de 0 a 4 (Figura 2).

Figura 2. Escala de notas desenvolvida para avaliar a qualidade dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar, após oito semanas de cultivo no escuro. Fotos: Marcondes Inácio da Silva

Notas	Características
 <p>0</p>	Tecido vegetal sem alterações ou calos não embriogênicos
 <p>1</p>	Menos de 25% da área do explante ocupada por massa embriogênica
 <p>2</p>	Entre 25 e 50% da área do explante ocupada por massa embriogênica
 <p>3</p>	Entre 50 e 75% da área do explante ocupada por massa embriogênica
 <p>4</p>	Mais de 75% da área do explante ocupada por massa embriogênica

Os dados obtidos das variáveis foram avaliados estatisticamente por meio de análise de variância e ajustados a curvas de regressão. Os dados das notas relativas às qualidades dos calos embriogênicos foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$, os demais dados não foram transformados. Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os explantes de cana-de-açúcar mantidos no meio de indução de calos apresentaram escurecimento, provavelmente devido à oxidação dos compostos fenólicos exsudados. Esse acontecimento já foi previamente descrito em cana-de-açúcar por Payet et al. (2005) e Duarte-Almeida et al. (2006). Os fenóis exsudados pelas células lesionadas, quando entram em contato com o oxigênio, sofrem reações de oxidação e resultam em produtos tóxicos, que podem ocasionar o escurecimento e a necrose dos explantes (RODRIGUES, 2003).

Os compostos fenólicos prejudicam a formação de calos embriogênicos em cana-de-açúcar, principalmente nas três primeiras semanas de cultivo, quando há uma maior exsudação de fenóis nesta espécie (LORENZO et al., 2001). Beruto et al. (1996) constataram que o alto índice de polímeros fenólicos não permitiram a regeneração de calos em *Ranunculus asiaticus* L. De modo semelhante, estudos de embriogênese somática em diferentes genótipos de cacau realizados por Santana et al. (2010) mostraram que grande parte dos explantes necrosados não formaram calos, provavelmente pelo efeito inibitório apresentado pelos compostos fenólicos no crescimento de tecidos.

Neste trabalho, o efeito prejudicial dos fenóis foi minimizado quando os explantes foram reposicionados a cada quatro dias dentro dos frascos de cultura, de forma que a oxidação da área lesionada não se espalhasse para todo o meio de cultura e, assim, os explantes permanecessem em áreas “limpas” do meio. Além disso, a adição de carvão ativado durante a maturação dos embriões somáticos parece ter contribuído para a redução desses compostos no meio de cultura. Segundo Tiel et al. (2006) o carvão ativado contribui para redução de compostos fenólicos exsudados por explantes de cana-de-açúcar.

A maioria dos explantes submetidos à indução de calos nas duas variedades estudadas, neste trabalho, teve um ganho expressivo de massa embriogênica, principalmente entre a terceira e quinta semana de cultivo, coincidindo com a fase em que, de acordo com alguns estudos, a exsudação de fenóis pelos explantes de cana-de-açúcar diminui consideravelmente (PAN e STADEN, 1998; LORENZO et al., 2001).

Alguns tratamentos com carvão ativado, utilizados durante a maturação dos embriões somáticos (últimas três semanas de cultivo no escuro), estimularam o aparecimento de raízes sobre a superfície dos calos em ambas as variedades estudadas

(Figura 3). O carvão ativado tem a característica de adsorver solutos e substâncias do meio de cultura, inclusive os reguladores de crescimento (THOMAS, 2008). Logo, a sua adição ao protocolo usual de indução embriogênica pode ter interferido no balanço de reguladores de crescimento do meio, estabelecendo um padrão diferente na germinação de alguns embriões somáticos.

Essa germinação precoce ocorreu nas últimas semanas da fase escura, quando o usual seria que os embriões germinassem somente após terem sido transferidos para o ambiente claro, o que pode ter favorecido o desenvolvimento de raízes e não da parte aérea. Na maioria das espécies vegetais o crescimento de raízes é amplamente favorecido pela ausência de luz (RADMANN et al., 2003; VIEIRA et al., 2007). Zaghmout e Torello (1998), em trabalho realizado com festuca vermelha (*Poaceae*), observaram que o pré-tratamento dos calos embriogênicos com carvão ativado aumentou a germinação precoce dos embriões somáticos devido à adsorção do 2,4-D e outras substâncias.

Figura 3. Calo embriogênico da variedade RB99395, pouco desenvolvido (nota 1), originado do tratamento com $1,50 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. A presença de raízes adventícias sobre a sua superfície (marcadas pelas setas) indica a germinação precoce de alguns embriões somáticos ainda na fase escura. Foto: Marcondes Inácio da Silva.



Em todos os tratamentos estudados houve o desenvolvimento de calos embriogênicos, com destaque para os tratamentos sem a adição de carvão ativado (Figura 6A). Como já foi mencionado, a provável adsorção dos nutrientes e reguladores de crescimento, pelo carvão ativado, inibiu o desenvolvimento de calos e a evolução da embriogênese somática nas duas variedades de cana.

Quando os calos embriogênicos foram transferidos para o claro, as primeiras alterações visíveis surgiram logo na primeira semana: observou-se o aparecimento de pontos pigmentados de verde revelando a presença de clorofila e indicando a germinação completa (parte aérea e raízes) dos embriões somáticos.

Os embriões somáticos originados de calos submetidos aos tratamentos com carvão ativado que haviam enraizado precocemente no escuro produziram plantas aparentemente normais quando transferidos para o claro (Figura 4). Por outro lado, os calos não embriogênicos, isto é, calos brilhantes e mucilagosos, não produziram qualquer tipo de organogênese mesmo tendo surgido nas mesmas condições que os calos embriogênicos. Em vez disso, necrosaram ou apresentaram pigmentos arroxeados como antocianinas. Culturas não embriogênicas de cana-de-açúcar e de outras espécies apresentam calos com estrutura morfológica semelhante (GILL et al., 2004; MACEDO, 2010).

Figura 4. Emissão de plantas em calo embriogênico da variedade RB92579 originado do tratamento de maturação de embriões somáticos com $1,50 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. Foto: Marcondes Inácio da Silva.



De acordo com o teste F da análise de variância, não houve interação significativa entre as variedades de cana-de-açúcar e as concentrações de carvão ativado utilizadas neste trabalho de embriogênese somática, em relação às três variáveis analisadas, indicando que esses fatores são independentes e, portanto, devem ser analisados separadamente (Tabela 1).

As variedades RB92579 e RB99395 de cana-de-açúcar diferiram estatisticamente, pelo teste F, em relação à porcentagem de calos embriogênicos ($p < 0,005$) e à qualidade dos calos embriogênicos ($p < 0,030$), por outro lado, essas variedades não diferiram estatisticamente em relação ao número de plantas regeneradas (Tabela 1).

Apenas a regressão quadrática teve efeito significativo para a porcentagem de calos embriogênicos ($p < 0,005$). Por outro lado, as regressões linear e quadrática tiveram efeitos altamente significativos tanto para a qualidade dos calos embriogênicos como para o número de plantas regeneradas, com $p < 0,001$ (Tabela 1).

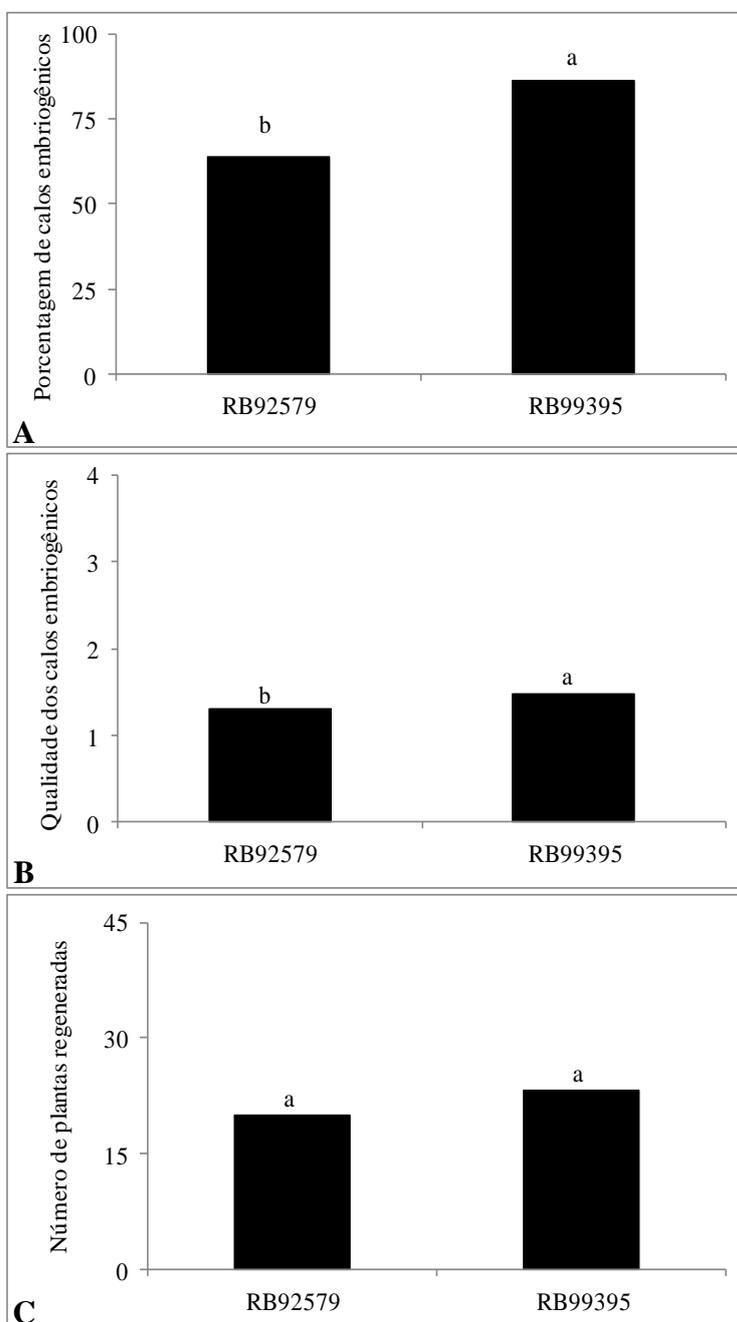
Tabela 1. Resumo da análise de variância para a porcentagem de calos embriogênicos, qualidade dos calos embriogênicos e número de plantas regeneradas.

Causa de variação	GL	Quadrados médios e (Probabilidades)		
		Porcentagem de CE	Qualidade dos CE	Nº de plantas regeneradas
Variedades (F1)	1	2963,7038 ($p < 0,005$)	0,0578 ($p < 0,030$)	64,4629 ^{ns}
Concent. de carvão(F2)	(3)	1296,1115 ($p < 0,016$)	0,2183 ($p < 0,001$)	780,6049 ($p < 0,001$)
Reg. Linear	1	924,6301 ^{ns}	0,3860 ($p < 0,001$)	1608,4480 ($p < 0,001$)
Reg. Quadrática	1	2963,7038 ($p < 0,005$)	0,2580 ($p < 0,001$)	733,3519 ($p < 0,001$)
Desvio de regressão	1	0,0008 ^{ns}	0,0107 ^{ns}	0,0148 ^{ns}
Interação F1 x F2	3	123,9515 ^{ns}	0,0259 ^{ns}	73,8333 ^{ns}
Tratamentos	7	1031,9847 ($p < 0,005$)	0,1129 ($p < 0,001$)	375,3968 ($p < 0,001$)
Resíduo	16	277,7783	0,0102	36,9398
Total	23			
CV (%)		22,22	7,76	28,20

NOTA: (ns) - não significativo: $p > 0,05$.

A variedade RB99395 apresentou resultados melhores que a variedade RB92579 na porcentagem de calos embriogênicos e na qualidade dos calos embriogênicos (Figura 5AB). Embora a variedade RB99395 tenha apresentado melhores calos embriogênicos do que a variedade RB92579, o número de plantas regeneradas não foi significativamente influenciado por isso (Figura 5C). A habilidade para indução de calos embriogênicos pode ser influenciada pelo genótipo (GANDONOU et al., 2005; CIDADE et al., 2006; LAKSHMANAN, et al., 2006). Todavia, a maioria dos protocolos estabelecidos tem induzido razoável nível de embriogênese somática em várias cultivares de cana-de-açúcar (LEMOS, 2009).

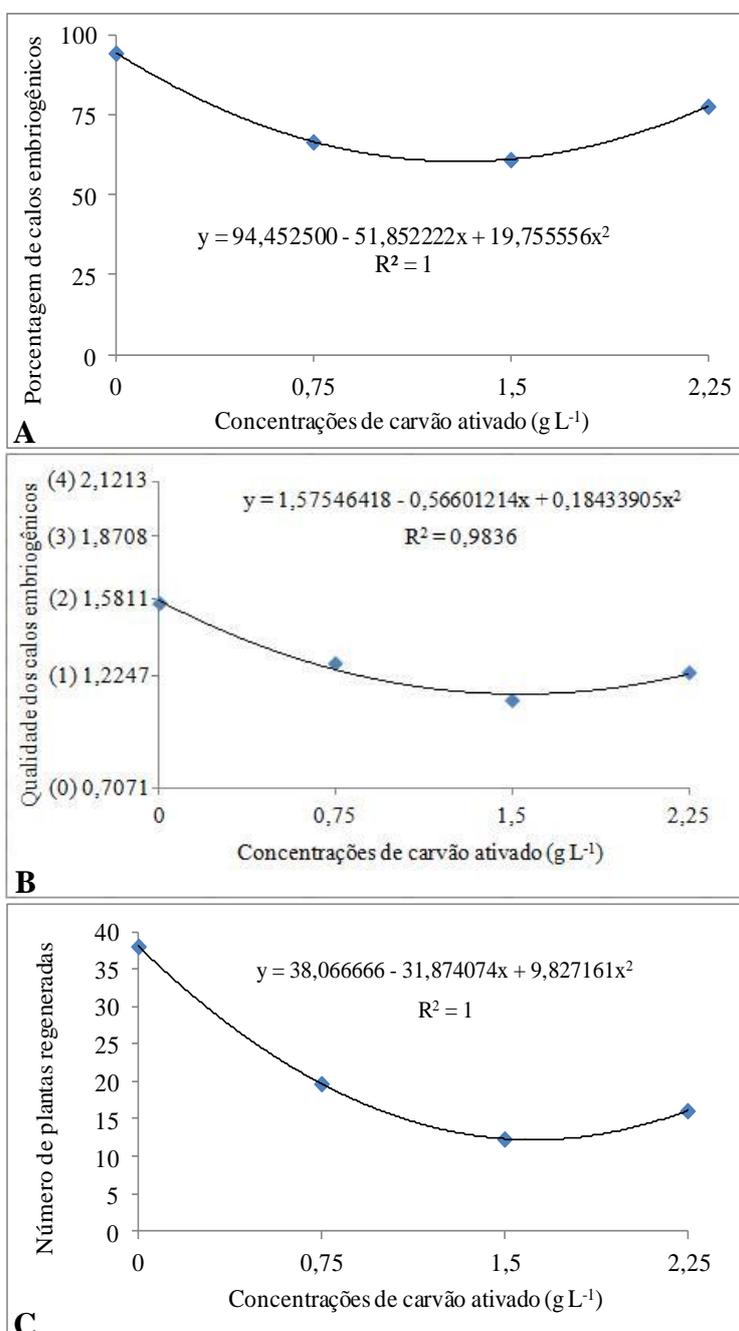
Figura 5. Diferença estatística, de acordo com o teste F, entre as duas variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado; A) – em relação à porcentagem de calos embriogênicos ($p < 0,005$); B) – em relação à qualidade dos calos embriogênicos ($p < 0,030$); C) – em relação ao número de plantas regeneradas (não significativo).



Os resultados de porcentagem de calos embriogênicos, de qualidade de calos embriogênicos e de número de plantas regeneradas das variedades RB92579 e RB99395, em função das concentrações de carvão ativado utilizadas no processo de

maturação dos embriões somáticos, foram melhor explicados por equações de 2º grau (Figura 6).

Figura 6. Análises de regressão mostrando os efeitos das concentrações de carvão ativado sobre as variedades RB92579 e RB99395, no processo de maturação dos embriões somáticos; A) – em relação à porcentagem de calos embriogênicos; B) – em relação à qualidade dos calos embriogênicos; C) – em relação ao número de plantas regeneradas.

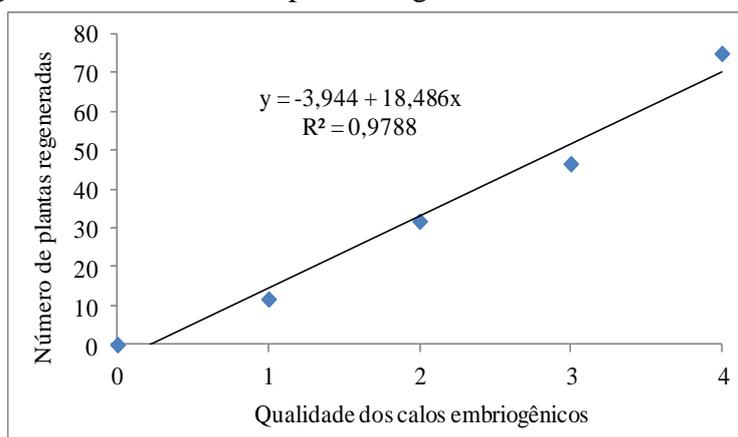


Neste estudo, os acréscimos do carvão ativado nos meios de cultivo, durante a maturação dos embriões, provocaram redução no desenvolvimento e germinação dos embriões somáticos, na fase clara, nas variedades RB92579 e RB99395 de cana-de-açúcar. Os tratamentos sem carvão ativado proporcionaram os melhores resultados para as variáveis estudadas (Figura 6).

De uma maneira geral, os aumentos das concentrações de carvão ativado, reduziram a porcentagem de calos embriogênicos, a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas (Figura 6). Resultados diferentes foram relatados por Macedo (2010) em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar da variedade SP-803280, onde na concentração de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado a taxa de diferenciação de embriões foi ótima. Essa variação de resultados entre os dois trabalhos pode ser atribuída, novamente, à influência do genótipo.

De acordo com a figura 7, houve correlação alta e positiva entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas, indicando que quanto melhor foi a qualidade dos calos maior foi o número de plantas regeneradas na fase clara (Figura 7).

Figura 7. Equação de 1º grau mostrando a correlação existente entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas.



CONCLUSÕES

A adição de carvão ativado ao meio de embriogênese reduz a porcentagem de calos embriogênicos, a qualidade de calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas, na fase clara, das variedades RB92579 e RB99395 de cana-de-açúcar, não sendo indicada o seu uso nessas variedades.

O carvão ativado estimulou a germinação precoce parcial dos embriões ainda no escuro causando o aparecimento apenas das raízes sobre os calos.

O escurecimento dos explantes, devido a exsudação dos compostos fenólicos, pode ser controlado com o reposicionamento frequente dos mesmos até a formação de calos embriogênicos.

Há uma correlação alta e positiva entre a qualidade dos calos embriogênicos e o número de plantas regeneradas das variedades RB92579 e RB99395 de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERUTO, M.; CURIR, P.; DEBERGH, P. Callus growth and somatic embryogenesis in thalamus tissue of *Ranunculus asiaticus* L. cultivated *in vitro*: Cytokinin effect and phenol metabolism. ***In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant***, v. 32, n. 3, p. 154-160, 1996.

BUCHHEIM, J. A.; COLBURN, S. M.; RANCH, J. P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. ***Plant Physiology***, v. 89, n. 3, p. 768-775, 1989.

CIDADE, D. A. P.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NOVOA, A. V.; LINARES, A. F.; LAJOLO, F. M.; GEVONESE, M. I. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) juice. ***Plant Foods for Human Nutrition***. v. 61, n. 4, p. 187-192, 2006.

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

GILL, N. K.; GILL, R.; GOSAL, S. S. Factors enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) ***Indian Journal of Biotechnology***, v. 3, n. 1, p. 119-123, 2004.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. ***Plant Cell Reports***, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, 2006.

LEMOS, E. E. P. Micropropagação de cana-de-açúcar. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Ed.). ***Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas***. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009, p. 257-286.

LORENZO, J. C.; BLANCO, M. A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2001.

MACEDO, A. F. **Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 3, p. 155-163, 1998.

PAYET, B.; SING, A. S. C.; SMADJA, J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 26, p. 10074–10079, 2005.

PULMANN, G. S.; GUPTA, P. K.; TIMMIS, R.; CARPENTER, C.; KREITINGER, M.; WELTY, E. Improved norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, n. 5, p. 271-279, 2005.

RADMANN, E. B.; GONÇALVES, E. D.; FORTES, G. R. L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro, no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 124-126, 2003.

RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. L.; FACHINELLO, J. C.; SILVA, J. B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2003.

SANTANA, G. F.; SALAZAR, R. V.; MATA, J. Efecto de la fuente de carbono sobre la organogénesis y embriogénesis somática em cacao. Análisis citogenético. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 60, n. 2, p. 193-202, 2010.

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

TIEL, K.; ENRÍQUEZ, G. A.; CEBALLO, Y.; SOTO, N.; FUENTES, A. D.; FERREIRA, A.; COLL, Y.; PUJOL, M. Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. **Biotecnología Aplicada**, v. 23, n. 1, p. 22-24, 2006.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 618-631, 2008.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 4, p. 507-511, 2004.

VIEIRA, R. L.; LEITE, G. B.; WAMSER, A. F. Efeito de substratos porosos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-9 (*Malus pumilla*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 128-132, 2007.

ZAGHMOUT, O. M. F.; TORELLO, W. A. Enhanced regeneration in long-term callus cultures of red fescue by pretreatment with activated charcoal. **HortScience**, v. 23, n. 3, p. 615-616, 1988.