



LETÍCIA RIOS VIEIRA

**INDUÇÃO, REGENERAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DE
CALOS DE VARIEDADES DE CANA-DE-
AÇÚCAR**

LAVRAS – MG

2015

LETÍCIA RIOS VIEIRA

**INDUÇÃO, REGENERAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DE
CALOS DE VARIEDADES DE CANA-DE-
AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Antonio Chalfun Júnior, PhD

Co-orientador: Dr. Luciano Coutinho Silva – UFPB

LAVRAS – MG

2015

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

Vieira, Letícia Rios.

Indução, regeneração e caracterização morfoanatômica de calos
de variedades de cana-de-açúcar / Letícia Rios Vieira. – Lavras :
UFLA, 2015.

60 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador(a): Antonio Chalfun Júnior.

Bibliografia.

1. *Saccharum* spp. 2. Cultura de tecidos. 3. Organogênese
indireta. 4. Potencial de Regeneração. 5. Caracterização
morfoanatômica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LETÍCIA RIOS VIEIRA

**INDUÇÃO, REGENERAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DE
CALOS DE VARIEDADES DE CANA-DE-
AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de Fevereiro de 2015.

Renato Paiva, PhD – UFLA

Dr. Marcelo Polo – UNIFAL-MG

Orientador Antonio Chalfun Júnior, PhD

Co-orientador: Dr. Luciano Coutinho Silva – UFPB

**LAVRAS – MG
2015**

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as oportunidades de conhecimento e amadurecimento. Por me ajudar a enfrentar todas as dificuldades e a enxergar a necessidade de cada uma delas. Obrigada, Deus, por me mostrar o caminho certo e me guiar sabiamente até a conquista de mais este sonho.

Agradeço ao meu marido Vinícius por todo amor, amizade, paciência e compreensão.

A minha família e amigos pelo incentivo, amor e carinho de sempre.

À equipe de funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal pela dedicação e comprometimento. Em especial, às amigas Daniella e Lena (Maria Helena), que tanto me alegraram com conversas ou simples sorrisos.

Ao Professor Antonio Chalfun Júnior pela orientação e oportunidade de aprendizado.

Aos colegas do LFMP pelo companheirismo nas horas de trabalho, nos cafezinhos e, principalmente, nos momentos difíceis. Em especial ao Cecílio Frois Caldeira Júnior pela paciência e por todo aprendizado.

Ao Professor Renato Paiva pela oportunidade de trabalhar no LCTP e conhecer essa equipe tão especial e importante pra mim.

Ao Professor e co-orientador Luciano Coutinho Silva que, mesmo longe, sempre se manteve solícito, atento e paciente.

Ao Professor Fabrício José Pereira por toda ajuda e esclarecimento, que tanto contribuíram para a essência do trabalho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal pelo incentivo e apoio à pesquisa e por permitir a conclusão de mais uma etapa profissional.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa e incentivo profissional.

E um agradecimento especial a todos os colegas, amigos e professores os quais tive o prazer de conhecer e conviver nesses dois anos de luta.

A todos vocês, muito obrigada!

“No semblante de um animal que não fala, há um discurso que somente um espírito sábio realmente entende”

Mahatma Ghandi

RESUMO

O estabelecimento *in vitro* e a calogênese em cana-de-açúcar permitem a produção em massa de materiais regeneráveis e de qualidade, essencialmente importantes para transformação genética. O objetivo geral do trabalho foi estabelecer protocolos eficientes para a produção de calos com potencial regenerativo das variedades RB 855156, RB 92579 e RB 867515, bem como caracterizá-los morfoanatomicamente, visando à transformação genética. A desinfestação do palmito foi feita por submersão em etanol 70% e hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo. A calogênese foi induzida em meio MS suplementado com 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, e os seguintes antioxidantes foram testados PVP (75, 150, 300 e 600 mg L⁻¹), ácido cítrico e ácido ascórbico (7,5; 15; 30 e 60 mg.L⁻¹). A caracterização morfológica dos calos foi por meio de classificação visual e a regeneração foi avaliada em três tempos de subcultivo. As análises anatômicas foram feitas por microscopia de luz. O protocolo de desinfestação foi eficiente para o estabelecimento *in vitro* das variedades RB855156 e RB92579. A variedade RB867515 apresentou contaminação endógena, impossibilitando seu cultivo. A calogênese foi eficiente, pois 100% dos explantes apresentaram calos. O melhor antioxidante testado foi o ácido cítrico (7,5 mg.L⁻¹), pois os explantes apresentaram os menores índices de oxidação (0,32) em relação ao controle (2,16). Foram estabelecidos três diferentes tipos de calos: branco nodular compacto (BN); translúcido friável (TF); e mucilaginoso (M). O calo BN assim como o TF possui alto potencial regenerativo aos 84 dias de cultivo (100 e 90%, respectivamente). O calo mucilaginoso não se regenera. As análises histológicas dos calos mostraram que há diferença estrutural entre eles e que seus brotos possuem origem organogênica. Os calos organogênicos das variedades RB 855156 e RB92579, portanto, são potencialmente transformáveis devido ao seu potencial regenerativo e estabelecimento *in vitro*.

Palavras-chave: *Saccharum* spp, potencial regenerativo, calos organogênicos.

ABSTRACT

Both the *in vitro* establishment and the callogenesis of sugarcane allow the mass production of quality regenerative material substantially important for genetic transformation. The overall objective of the study was to establish protocols for the efficient production of calli with the regenerative potential of varieties RB855156, RB92579 and RB867515, as well as their characterization regarding morphology and anatomy aiming the genetic transformation. The palm disinfection was carried out by submersion in 70% ethanol and sodium hypochlorite at 2% active chlorine. Callogenesis was induced in MS medium supplied with 3,0 mg L⁻¹ 2,4-D, and the following antioxidants were evaluated PVP (75; 150; 300 and 600 mg L⁻¹), citric acid, and ascorbic acid (7,5; 15; 30 and 60 mg L⁻¹). Morphological characterization of calli was carried out by visual classification and regeneration was evaluated in three different moments. The anatomical analyzes were performed by light microscopy. The disinfection protocol was efficient for the *in vitro* establishment of varieties RB855156 and RB92579. Endogenous contamination prevented the cultivation of RB867515. The callogenesis was efficient, since 100% explants produced callus. The best antioxidant was the citric acid (7,5 mg L⁻¹) as the explants exhibited lower oxidation rates (0,32) compared to the control (2,16). Three different types of calli were established: white compact nodular (BN); translucent friable (TF); and mucilaginous (M). Both BN and TF calli have high regenerative potential after 84 days of culture (100 and 90%, respectively). The mucilaginous callus does not regenerate. The anatomical analysis showed that there are structural differences between calli and their shoots are from organogenesis. Therefore, organogenic calli of RB855156 and RB 92579 varieties are potentially transformable due to their regenerative potential and *in vitro* establishment.

Key words: *Saccharum* spp, regenerative potential, organogenic calli

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1. A Cana-de-açúcar	12
2.2. Produção e Importância Econômica.....	13
2.3. Variedades RB.....	14
2.4. Melhoramento e Transformação Genética de Plantas.....	15
2.5. Cultura de Tecidos Vegetais.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Material Vegetal	20
3.2. Preparo do Material	20
3.3. Desinfestação.....	21
3.4. Meio de Indução à Calogênese.....	21
3.5. Introdução do Material <i>in vitro</i> e Condições de Crescimento.....	21
3.6. Subcultivos	22
3.7. Meio de Regeneração	22
3.8. Avaliação da Contaminação e da Oxidação	23
3.9. Identificação dos Diferentes Tipos de Calos	23
3.10. Teste de Oxidação ao Longo do Palmito.....	24
3.11. Teste de Antioxidantes	24
3.12. Teste de Regeneração	25
3.13. Análises Anatômicas	25
3.14. Análises Estatísticas	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

4.1. Contaminação bacteriana impediu o estabelecimento <i>in vitro</i> da variedade RB867515	27
4.2. Pré-tratamento com solução antioxidante soluciona oxidação instantânea causada pela excisão do explante.	32
4.3. Os diferentes tipos de calos identificados são morfológicamente idênticos nas variedades RB855156 e RB92579.....	34
4.4. Os explantes retirados da base do palmito oxidam menos e o ácido cítrico foi o mais eficiente na função antioxidante	36
4.5. Teste de Regeneração mostra que o potencial regenerativo dos calos diminui bruscamente ao longo dos subcultivos.....	39
4.6. Existem diferenças estruturais entre os três tipos de calos e os brotos regenerados possuem origem organogênica	42
5. CONCLUSÕES.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das culturas de maior importância na economia mundial, sobretudo por seus principais produtos, como o açúcar e o etanol. O Brasil é o maior produtor mundial da cultura, além de ser um dos maiores representantes do setor sucroalcooleiro mundial. A busca por fontes de energia renováveis é uma tendência mundial no setor energético e a cana-de-açúcar destaca-se como uma das espécies pioneiras na produção de bioetanol.

As técnicas de melhoramento genético clássico permitem cruzamentos controlados entre espécies no intuito de mesclar características comercialmente importantes. Devido às limitações intrínsecas destas técnicas, os melhoramentos promovidos por transformação genética e manipulação de genes específicos ganham espaço a cada dia.

Os novos métodos de transformação genética de plantas contam com o auxílio da cultura de tecidos vegetais para a obtenção de materiais de qualidade a serem transformados. O cultivo *in vitro* e a micropropagação de plantas pode ser potencializado tanto por via embriogênica ou organogênica, resultando em materiais capazes de regenerar uma planta completa. A elaboração de protocolos eficientes para a obtenção e regeneração desse material visa a um maior crescimento vegetativo *in vitro*, assim como melhorias na sua qualidade e integridade.

A micropropagação possui alguns pontos que necessitam de atenção especial, tais como a assepsia, o tipo de explante, o meio de cultivo e as condições de crescimento. Os protocolos podem variar de acordo com o explante ou variedade utilizada. Em cana-de-açúcar é comum o uso de auxina para a indução de calos a partir das folhas imaturas, no entanto, contaminações endofíticas e oxidação são fatores que prejudicam a obtenção destes.

Para qualificar o material vegetal e testar se ele é potencialmente transformável, é necessário conhecer em detalhes o tipo de material vegetal cultivado, bem como observar atentamente o processo de regeneração *in vitro*. Caracterizações morfológicas visuais, testes de regeneração e análises anatômicas são de fundamental importância para o conhecimento específico e para a escolha do material vegetal a ser transformado.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) é uma gramínea perene pertencente à família Poaceae. Originária das regiões da Indonésia e Nova Guiné (JADOSKI et al., 2010), é cultivada no Brasil desde o século XVI (LEITE et al., 2008). Suas folhas são presas aos nós dos colmos por uma bainha invaginante e distribuem-se de forma alterna e oposta. Possui inflorescência do tipo panícula com flores andróginas e o crescimento do caule é cilíndrico com colmos limitados por nós e entrenós. Sua reprodução é sexuada, porém na produção comercial utiliza-se a propagação vegetativa para a obtenção de clones (EVERT, 2006).

As variedades de cana-de-açúcar cultivadas atualmente são híbridos interespecíficos cujas constituições genéticas têm participação das espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule* (JADOSKI et al., 2010). Essas espécies selvagens possuem importantes características comerciais, as quais levaram ao sucesso de muitas variedades obtidas por meio de melhoramento genético tradicional (CESNIK & MIOCQUE, 2004).

Suas relevantes características fisiológicas fazem com que a cana seja uma das culturas de metabolismo C4 mais importantes do mundo na produção de alimentos (MARIN & NASSIF, 2013). Possui alta taxa fotossintética, eficiente utilização do CO₂ atmosférico e tolerância a altas temperaturas, o que faz com que os canaviais sejam encontrados em uma ampla faixa de latitude e longitude no Brasil e no mundo (MOORE & BOTHA, 2014). Por esses motivos, há um crescente aumento da produção e do interesse comercial e econômico pela cultura.

2.2. Produção e Importância Econômica

O gênero *Saccharum* possui grande importância econômica no mundo, sendo responsável por 70% da produção mundial de açúcar (LAKSHMANAN, 2006). O Brasil é o principal fornecedor de açúcar para mais de 100 países, incluindo Rússia, Índia, Irã e Emirados Árabes. Grande parte do etanol produzido no Brasil é consumida pelo mercado interno. Além disso, de acordo com a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA, 2010), o país é responsável por 20% da produção mundial e também 20% das exportações mundiais.

O potencial econômico da cana-de-açúcar está no colmo, do qual são retirados os compostos de interesse. A sacarose é destinada à produção de etanol e açúcar; outros açúcares não-redutores são utilizados na fabricação de melaço; e as fibras restantes podem ser utilizadas pela própria indústria como fonte de energia (TOPPA et al., 2010).

O Brasil é o maior produtor mundial da cultura em virtude de suas características edafoclimáticas, seguido por Índia e China. Na safra 2014/15, a área cultivada com cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira será de aproximadamente 9.004,5 mil hectares (CONAB, 2014). Dessa forma, o país assume o posto de maior produtor mundial de açúcar, sendo responsável por mais de 50% do mercado internacional desta commodity agrícola, além da produção de etanol de cana-de-açúcar (MARIN & NASSIF, 2013; CONAB, 2014/2015).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014), a produção total de cana-de-açúcar moída na safra 2014/15 é estimada em 642,1 milhões de toneladas. Desse montante, 43,75% é destinado à produção de açúcar, estimada em 36,36 milhões de toneladas. O restante, que equivale a 361,37 milhões de toneladas, é destinado à produção de etanol. Estima-se que serão gerados 28,66 bilhões de litros de etanol nessa mesma safra.

Atualmente, o setor sucroenergético conta com 70 mil produtores de cana-de-açúcar que geram 1,2 milhão de empregos diretos, além de um PIB setorial de US\$ 48 bilhões e exportações chegando a US\$ 15 bilhões. De acordo com o último Relatório de Sustentabilidade da UNICA (2010), esse é o setor que mais gera empregos diretos, quando comparados com os setores de soja, arroz, café, milho e mandioca. É também o segundo melhor em relação à média salarial dos trabalhadores do campo, abaixo apenas do setor da soja.

2.3. Variedades RB

O Catálogo Nacional de variedades RB de cana-de-açúcar (RIDESA, 2010) destacou três variedades consideradas comercialmente importantes: RB855156, RB92579 e RB867515. Uma das principais diferenças fisiológicas entre elas é em relação à maturação, ou seja, passagem do estado vegetativo para o reprodutivo: precoce, média e tardia, respectivamente.

A variedade RB 855156 é a mais cultivada para início de safra devido a sua maturidade precoce. Essa característica tem sido cada vez mais procurada, pois é no período inicial da safra que se tem a maior falta de matéria-prima com alta riqueza de sacarina. Possui um perfilhamento regular, crescimento ereto e despalha fácil. No aspecto fitossanitário não requer nenhum cuidado especial, pois é bastante resistente às principais doenças como: carvão, escaldadura-das-folhas, estrias vermelhas, ferrugem marrom e mosaico.

A variedade RB92579 tem maturidade média. Possui excelente produtividade agrícola, ótimo perfilhamento, fechamento da entrelinha e brotação das socarias. Seu porte é semiereto, com ótima colheabilidade, recuperação após períodos de seca, tem alta responsividade à irrigação e eficiência no uso da água. Também possui alta eficiência no uso dos nutrientes, ótimo teor de sacarose, maturação média e é tolerante a

herbicidas. Tem florescimento baixo, é tolerante ao ataque da broca comum, resistente à ferrugem marrom e à escaldadura das folhas, além de ser moderadamente resistente ao carvão.

A RB867515 possui maturação tardia. Tem hábito de crescimento ereto, perfilhamento médio e despalha fácil. Possui colmos de cor verde arroxeada e boa capacidade de brotação, mesmo em plantio tardio em baixas temperaturas. Pode ocorrer florescimento, mas o chochamento não compromete a produção em função do crescimento expressivo.

2.4. Melhoramento e Transformação Genética de Plantas

A arquitetura genômica da cana-de-açúcar impõe dificuldades para o processo de desenvolvimento de novas variedades. A poliploidia (mais de dois genomas no mesmo núcleo) faz com que a propagação por sementes seja comercialmente inviável por produzir uma prole altamente diversificada (SCHIFINO-WITTMANN, 2004). Nesse caso, o processo mais comum para criação de novas variedades é o cruzamento entre plantas da mesma espécie (CESNIK & MIOCQUE, 2004).

A maioria das variedades de cana ainda é obtida através do melhoramento clássico (ANDRADE et al., 2011; SILVA & GONÇALVES, 2011; CARVALHO & FURTADO, 2013). Porém suas limitações vêm forçando o desenvolvimento de novas técnicas de melhoramento genético. Uma dessas técnicas é a transformação genética, que permite gerar plantas com fenótipos inatingíveis pelo melhoramento convencional (BIRCH, 1997).

De acordo com Birch (1997), existem três requisitos essenciais para a produção de plantas transgênicas: (a) um tecido alvo que possua células competentes para a regeneração de uma planta; (b) um método de introduzir o material genético nas células regeneráveis; e (c) um processo de seleção e regeneração das plantas transformadas em uma frequência satisfatória.

Os métodos de transformação genética de plantas dependem das técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, uma vez que é necessário que se estabeleça um protocolo eficiente para o estabelecimento do material vegetal e a regeneração de plantas inteiras a partir de células transformadas (NEWELL, 2000). Muitas vezes essa etapa é limitante na obtenção de plantas transgênicas tendo em vista as dificuldades intrínsecas ao processo de regeneração *in vitro* (STUDART-GUIMARÃES, LACORTE E BRASILEIRO, 2003). A escolha do material vegetal a ser transformado, bem como seu método de obtenção e sua qualidade regenerativa tornam-se primordiais para o sucesso da técnica.

2.5. Cultura de Tecidos Vegetais

As técnicas de cultura de tecidos são imprescindíveis em trabalhos de transformação genética, estando presentes desde a fase de estabelecimento do explante até o momento da regeneração e aclimatização do transformante obtido. Em programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, é necessária a multiplicação do material selecionado com rapidez e eficiência, atributos que podem ser obtidos pela micropropagação de plantas (CIDADE et al., 2006).

Um explante vegetal pode dar origem a órgãos ou embriões de forma direta ou indireta. Os processos de organogênese e embriogênese indireta passam necessariamente pelo processo de calogênese. Os calos embriogênicos são um aglomerado de células desdiferenciadas capazes de gerar embriões pelo processo de embriogênese somática. Esses embriões somáticos possuem potencial regenerativo alto e são semelhantes aos embriões zigóticos, além de serem bipolares e possuírem órgãos embrionários típicos, como radícula, hipocótilo e cotilédones (ARNOLD et al., 2002).

Na maioria das variedades de cana-de-açúcar o material mais utilizado para transformação é o calo embriogênico obtido a partir de folhas imaturas, independentemente do método escolhido (SANTOSA et al., 2004; VAN DER VYVER et al., 2013; MUDRY et al., 2013). A calogênese em cana é obtida a partir das folhas imaturas do ápice caulinar, denominadas palmito (VAN DER VYVER et al., 2013; MUDRY et al., 2013). Segundo Santosa et al. (2004), a escolha do calo é devido à facilidade com que são obtidos em relação a explantes meristemáticos.

Diversos autores relatam que a formação de calos embriogênicos em variedades de cana-de-açúcar é obtida com a utilização de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético) em concentrações que variam de 2,0 a 4,0 mg L⁻¹ (ATTIA et al., 2005; DIBAX et al., 2013; MUDRY et al., 2013) sendo, na maioria dos casos, 3,0 mg L⁻¹ a concentração mais utilizada (JAHANGIR & NASIR, 2010; VAN DER VYVER et al., 2013; SOARES et al., 2014).

Na cultura de tecidos é essencial que haja a prevenção e o controle da contaminação microbiana, uma vez que o meio de cultivo torna-se um ambiente ideal para o crescimento de bactérias, leveduras e fungos (PALU et al., 2011). Microrganismos epífitos, que vivem na superfície das plantas (HIRANO & UPPER, 1990), geralmente são eliminados de maneira simples. A contaminação por bactérias endofíticas pode ser limitante ao cultivo *in vitro* ou exigir maior tempo, gasto de material vegetal e recursos financeiros (PALU et al., 2011). Uma das soluções encontradas é o uso de antibióticos no meio de cultura, que podem ter ação bacteriostática ou bactericida (PEREIRA et al., 2003). Entretanto, para que o antibiótico seja eficiente é indispensável que se tenha uma identificação precisa da bactéria causadora da contaminação (THOMAS, 2004).

Outro problema que afeta o cultivo *in vitro* de diversas espécies é o alto teor de compostos fenólicos e a oxidação do material vegetal (ROBARDS et al., 1999). O aumento na produção de compostos fenólicos é uma reação de proteção vegetal, resultante das lesões causadas pelo corte do

explante (NORTH, NDAKIDEMI e LAUBSCHER, 2010). Enzimas como polifenoloxidasas e peroxidases utilizam compostos fenólicos como substrato (ROBARDS et al., 1999) e a oxidação desses fenóis resulta em compostos como as quinonas. Elas são responsáveis pela coloração marrom das culturas e podem causar a inibição do crescimento e a morte de um grande número de explantes (MELO et al., 2001; BASSAN et al., 2006).

Algumas estratégias podem ser utilizadas para minimizar a formação desses compostos como: lavagem do material vegetal em água corrente antes da desinfestação, utilização de antioxidantes, redução de danos mecânicos e químicos no explantes, redução da luminosidade da câmara de fluxo laminar e incubação inicial dos explantes no escuro (MONACO et al., 1977; CALDAS et al., 1998; SARTOR et al., 2013). Antioxidantes como polivinilpirrolidona (PVP), carvão ativado, ácido ascórbico e ácido cítrico são os mais citados na literatura (MELO et al., 2001; SARTOR et al., 2013; BASSAN et al., 2006), inclusive para o cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar (CIDADE et al., 2006; DIBAX et al., 2013; SOARES et al., 2014).

Os antioxidantes possuem maneiras diferentes de minimizar/evitar a oxidação. O ácido ascórbico reduz as quinonas disponíveis no meio em produtos incolores e estáveis. Essa reação é irreversível e, portanto, temporariamente eficaz. O ácido cítrico diminui o pH do meio, deixando-o abaixo do ótimo de ação de enzimas oxidantes (polifenoloxidasas e peroxidases), além de exercer efeito inibidor sobre a polifenoloxidase por quelação do cobre no sítio ativo da enzima (HE & LUO, 2007). O PVP é um polímero adsorvente que possui ação não enzimática. É utilizado em diversas áreas por sua alta capacidade de complexação com polifenóis (BORNEMAN, GTKMEN e NIJHUIS, 1997)

Para algumas espécies a combinação entre antioxidantes pode apresentar resultados mais eficazes. Loredó-Carrillo et al. (2013) mostraram que a combinação entre PVP, ácido cítrico e ácido ascórbico foi mais eficiente que a utilização destes separadamente no estabelecimento de calos de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.). Já para controle da oxidação em

embriões zigóticos da guarirobeira, o ácido ascórbico se mostrou mais eficiente (MELO et al., 2001). A oxidação em calos de diferentes espécies de *Acacia* pode ser controlada com o uso de ácido ascórbico (*A. catechu*) ou PVP (*A. auriculiformis*) (VENGADESAN et al., 2002). Para algumas variedades de coqueiro, ácido cítrico e ácido ascórbico apresentaram a mesma eficiência (SIQUEIRA & INOUE, 1991).

Com o presente trabalho, objetivou-se verificar a eficiência dos protocolos comumente utilizados para desinfestação e indução à calogênese nas variedades RB855156, RB92579 e RB867515; testar a eficiência de diferentes antioxidantes, em diferentes concentrações, a fim de diminuir a oxidação; testar o potencial regenerativo dos diferentes tipos de calos em diferentes tempos; e caracterizar morfo e histologicamente os diferentes tipos de calos e brotos a fim de comprovar sua origem. Os calos com alto potencial de regeneração são possivelmente transformáveis e, por isso, os mais indicados como material alvo no processo de transformação genética.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (<http://www.dbi.ufla.br/lfmp/>) e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (<http://www.lctp.dbi.ufla.br/>), ambos no Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG – Brasil.

Para a realização do estudo foram utilizadas três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) com idade de 8 a 10 meses, RB 85 5156, RB 92 579 e RB 86 7515 cedidas pela BASF- The Chemical Company.

3.2. Preparo do Material

As plantas utilizadas para o experimento foram cortadas na base onde as folhas verdes completamente expandidas estão fixas no colmo. Algumas folhas mais externas do ponteiro da cana foram retiradas e levadas para o laboratório. Dentro do ponteiro encontra-se o ápice caulinar, contendo o meristema apical envolto por folhas jovens imaturas, as quais são chamadas de “palmito”. Esse palmito foi utilizado como fonte de explante e, ainda envolto por algumas folhas esverdeadas, lavado em água corrente durante cinco minutos para uma limpeza superficial. Em uma proveta cheia de água destilada, os palmitos foram levados para câmara de fluxo laminar, onde foi submetido ao processo de desinfestação.

3.3. Desinfestação

Em câmara de fluxo laminar, os palmitos foram mergulhados em etanol 70% por um minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo por 20 minutos. Após o descarte do excesso de hipoclorito, foi feita uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavagem para eliminar os resíduos do agente desinfestante. A desinfestação foi feita separadamente para cada variedade e a inoculação foi feita logo em seguida.

3.4. Meio de indução à calogênese

Para indução à calogênese foi utilizado o meio basal MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 3% de sacarose, 2,3 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma) como agente gelificante, 100 mg L⁻¹ do antioxidante Polivinilpirrolidona (PVP), e 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, indicado na literatura como a melhor concentração para indução de calos embriogênicos (JAHANGIR & NASIR, 2010; VAN DER VYVER et al., 2013; SOARES et al., 2014). O pH do meio foi ajustado em 5,8 ± 1 e o meio foi autoclavado em tubos de ensaio com aproximadamente 15 mL deste, por 20 minutos a 1 atm de pressão.

3.5. Introdução do material *in vitro* e condições de crescimento

Após a desinfestação do palmito, outras duas folhas externas foram retiradas a fim de se obter o cilindro de folhas imaturas acima do último nó (o mais apical), com aproximadamente 15 cm de altura e 1 cm de diâmetro. Os explantes foram cortados da base do último nó para o ápice.

Devido ao alto nível de oxidação, um pré-tratamento utilizando solução antioxidante no ato do fracionamento do palmito foi realizado.

Preparou-se uma solução de PVP a 500 ppm, na qual o bisturi foi mergulhado a cada corte. Os explantes de 1 a 2 mm de espessura foram cortados e inoculados individualmente em cada tubo.

Quatrocentos e cinquenta explantes foram inoculados, sendo 150 de cada variedade e 50 retirados de cada palmito. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz, com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, por 140 dias. Os explantes contaminados ou completamente oxidados foram descartados.

3.6. Subcultivos

Os explantes foram subcultivados em placas de Petri estéreis e descartáveis contendo 25 mL de meio a cada 28 dias. Os explantes foram fracionados em quatro ou cinco partes, dependendo do tamanho e do desanelamento natural do explante que ocorre quando há formação de calo. Cada explante deu origem a uma placa e aqueles explantes, ou parte deles, que não desenvolveram massa calogênica foram descartados. Os materiais subcultivados foram mantidos em sala de crescimento escura durante a calogênese. Foram feitos quatro subcultivos, totalizando 140 dias de cultivo.

3.7. Meio de Regeneração

A regeneração dos calos foi realizada em meio MS livre de 2,4-D (LIMA et al., 2001; MUDRY et al., 2013). Os calos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 90 dias.

3.8. Avaliação da Contaminação e da Oxidação

Os 450 explantes (oriundos das três variedades) inoculados foram avaliados a cada sete dias. A contaminação foi classificada em bacteriana ou fúngica e os explantes foram avaliados com presença ou ausência desses tipos de contaminantes. Para aumentar a confiabilidade da análise visual, criou-se um padrão para melhor avaliar o nível de oxidação dos palmitos ao longo da avaliação, sendo: 0 (zero) o explante não oxidado; 1 (um) o explante levemente ou com parte oxidada; e 2 (dois) o explante muito ou totalmente oxidado (Figura 1).

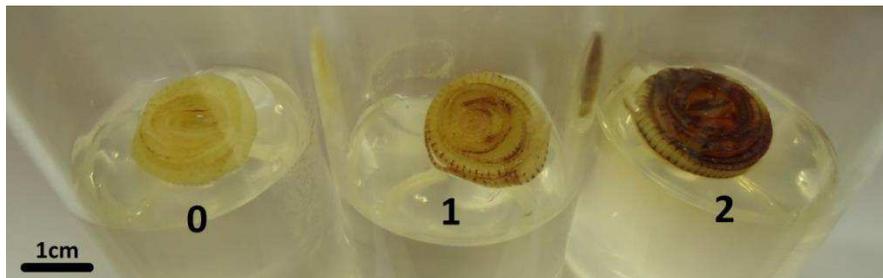


Figura 1: Padrão de oxidação utilizado para classificar os explantes, sendo: 0 (zero) o explante não oxidado; 1 (um) o explante levemente ou com parte oxidada; e 2 (dois) o explante muito ou totalmente.

3.9. Identificação dos Diferentes Tipos de Calos

Ao longo dos quatro subcultivos, foram feitas observações a cada 7 dias com o auxílio de uma lupa, que permitiram a identificação da formação diferentes tipos de calos: brancos nodulares compactos, translúcidos friáveis e mucilaginosos.

Devido à grande semelhança entre o desenvolvimento *in vitro* dos calos das variedades RB855156 e RB92579, decidiu-se realizar os demais experimentos apenas com a RB92579. A escolha foi feita baseada em

critérios como maturação intermediária entre as variedades, menores índices de contaminação e oxidação e disponibilidade de material para coleta.

3.10. Teste de Oxidação ao Longo do Palmito

Uma nova inoculação foi realizada com o objetivo de verificar se a oxidação nos explantes é influenciada pelo seu posicionamento no palmito (basal – apical). Para isso foram inoculados cinco palmitos da variedade RB 92579 e seus explantes foram enumerados de um a 30 (do mais basal ao mais apical). Os níveis de oxidação receberam notas: não oxidado (nota 0); pouco oxidado (nota 1); oxidado (nota 2); e muito oxidado (nota 3). Na tentativa de diminuir os níveis de oxidação, fez-se um teste com diferentes antioxidantes em diferentes concentrações.

3.11. Teste de Antioxidantes

Uma nova inoculação foi feita, alterando o agente antioxidante e suas concentrações. O teste foi feito com três antioxidantes em quatro concentrações distintas: ácido ascórbico e ácido cítrico utilizados nas concentrações de 7,5, 15, 30 e 60 mg L⁻¹ (ambos microfiltrados antes da adição ao meio já autoclavado), e PVP a 75, 150, 300 e 600 mg L⁻¹. O controle foi feito com água ao invés do antioxidante. As soluções para mergulhar o bisturi antes do corte também foram feitas com as mesmas concentrações de antioxidante do meio de cultivo.

Cinco placas foram inoculadas com três explantes em cada, totalizando 15 explantes para cada concentração de antioxidante, além do controle. Os explantes foram colocados aleatoriamente nas placas, de modo que cada tratamento continha explantes basais e apicais. As avaliações foram feitas a cada sete dias durante 42 dias.

3.12. Teste de Regeneração

Para verificar em qual tempo a taxa de regeneração dos calos é mais elevada, um teste de regeneração com cada tipo de calo em cada subcultivo foi realizado. Ao final de cada subcultivo, 10 porções de cada um dos calos foram separadas e colocadas em meio de regeneração em condições apropriadas. Cada porção foi classificada como um evento de regeneração, totalizando 10 eventos de regeneração de cada tipo de calo em cada tempo. As avaliações foram feitas aos 84, 112 e 140 dias de cultivo (R2, R3 e R4, respectivamente).

3.13. Análises Anatômicas

Foram feitas análises anatômicas dos diferentes tipos de calos pela técnica de microscopia de luz a fim de verificar se há diferenciação histológica entre eles. Os diferentes tipos de calos mantidos no escuro e os brotos regenerados após sete e 15 dias de exposição à luz foram fixados em FAA (formaldeído, ácido acético e álcool 70%) por 72 horas e mantidos em etanol 70% para posteriores análises. Os tecidos fixados passaram por um processo de desidratação e posterior emblocamento com Kit de Histoiresina da marca Leica[®]. Os cortes foram feitos em micrótomo semiautomático e corados com Azul de Toluidina. As imagens foram feitas no Laboratório de Anatomia Vegetal (UFLA), em microscópio com uma câmera OLYMPUS acoplada, na resolução 1024X768 e em diferentes aumentos. Foram tratadas com o auxílio do programa GIMP (The GNU Image Manipulation Program) e as escalas colocadas com o programa Image J.

3.14. Análises Estatísticas

As avaliações de contaminação e oxidação da primeira inoculação foram feitas por análise qualitativa descritiva.

A oxidação ao longo do palmito foi avaliada por análise de variância ANOVA, seguida de uma regressão linear múltipla para verificar se há relação entre a oxidação e a posição do explante.

Para o teste de antioxidantes foi feita uma análise de variância ANOVA com dois critérios, sendo eles os diferentes tratamentos (12 tratamentos + controle) e as semanas avaliadas.

A regeneração foi avaliada pela taxa de eventos regenerados em cada tipo de calo e em cada tempo avaliado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contaminação bacteriana impediu o estabelecimento *in vitro* da variedade RB867515

A contaminação bacteriana afetou o cultivo das três variedades, no entanto, houve o estabelecimento *in vitro* de duas delas (Figura 2A e 2B). O alto índice de contaminação na variedade RB867515 (Figura 1C) impossibilitou seu cultivo *in vitro*, uma vez que houve a morte de todos os explantes assim que foram subcultivados. Outros testes utilizando palmitos da RB867515 advindos de localidades diferentes foram realizados. Todos os explantes também foram contaminados, aparentemente, pelo mesmo tipo de bactéria. Esses resultados sugerem que essas bactérias são endógenas. Segundo FANG & HSU (2012) é impossível eliminar a contaminação endógena somente com o uso de desinfestação superficial.

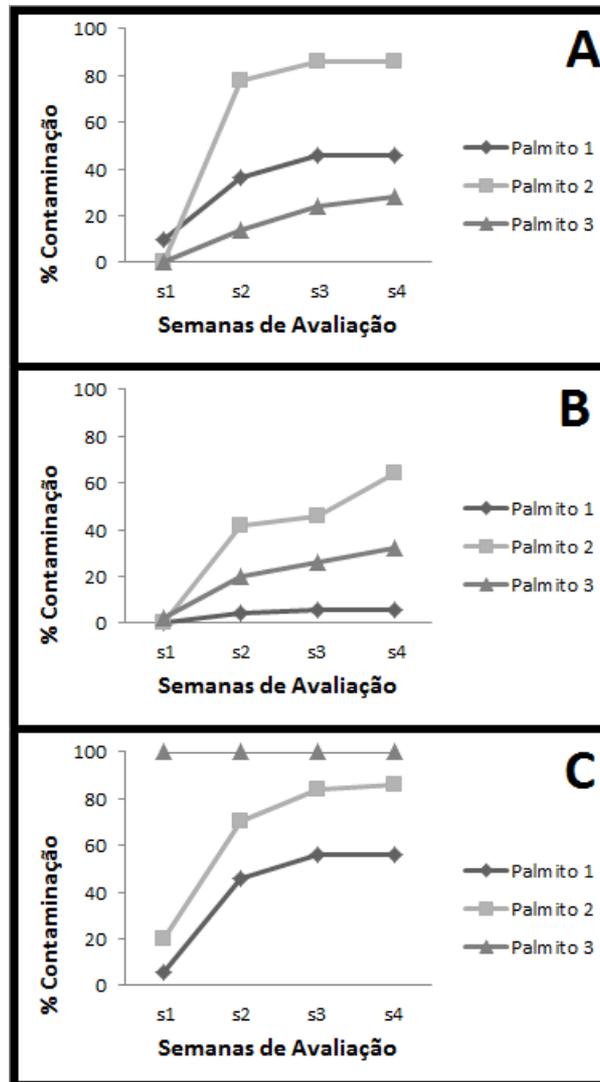


Figura 2: Percentual de contaminação bacteriana nas variedades RB855156 (A), RB92579 (B) e RB867515 (C), sendo que cada linha representa os explantes de um mesmo palmito e S1, S2, S3 e S4, as avaliações de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente.

O crescimento bacteriano no restante dos explantes da variedade RB867515 ocorreu após a troca do meio de cultivo. Isso pode ter ocorrido devido ao baixo número de bactérias no explante e ao padrão sigmoidal do crescimento bacteriano. Ainda no primeiro subcultivo, as bactérias atingiram a fase de declínio, não havendo crescimento suficiente para que fossem

visualizadas à lupa. Ao subcultivar os explantes, a curva de crescimento se reestabeleceu, iniciando uma nova fase de crescimento exponencial que as tornou visíveis à lupa (ZWIETERING et al., 1990). Outra hipótese seria a de que as bactérias se apresentavam em estado de latência, retomando seu crescimento ao serem subcultivadas (LEIFERT, RITCHIE e WAITES, 1991).

Aparentemente, houve crescimento de quatro tipos diferentes de bactérias (Figura 3), sendo que os explantes de um mesmo palmito contaminaram-se com somente um dos tipos. As contaminações dos explantes dos palmitos da RB92579 e RB855156 podem ser: de origem epífita, sugerindo que a desinfestação não foi eficiente para a total eliminação das bactérias; ou endógenas, habitando apenas parte da planta (LEIFERT, RITCHIE e WAITES, 1991).

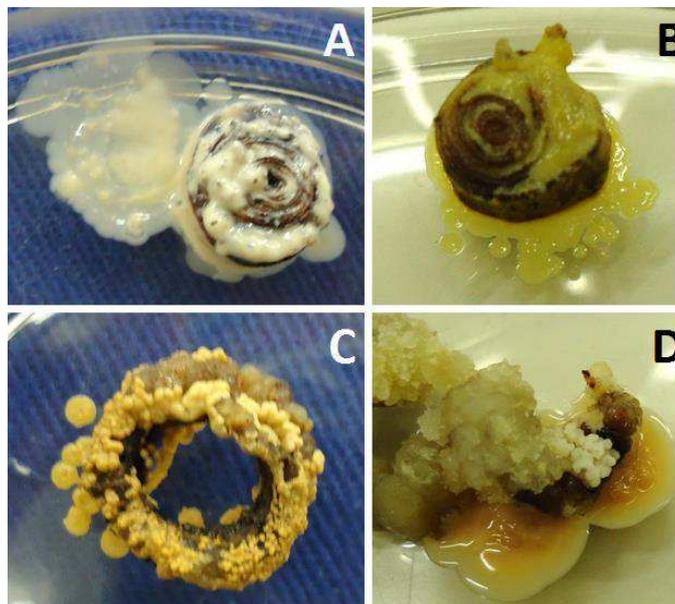


Figura 3: Diferentes bactérias encontradas durante o cultivo *in vitro* das variedades de cana-de-açúcar.

Algumas bactérias endógenas são benéficas ao cultivo *in vitro* de espécies como a banana (*Musa accuminata* AA cv. Grand Naine) (JIMTHA

et al., 2014). Nas variedades de cana em estudo, a contaminação não foi benéfica ao explante, pois os mesmos apresentaram uma intensa oxidação e posterior morte. A alta oxidação dos explantes contaminados se deve ao aumento na produção de compostos fenólicos. As quinonas resultantes da oxidação desses compostos possuem propriedades antimicrobianas, uma forma de proteção natural do explante contaminado (BRONDANI et al., 2003).

O uso de antibióticos bacteriostáticos no meio de cultivo pode ser uma opção viável para o controle das bactérias endógenas (PALU et al., 2011). Para tal, é imprescindível que se faça a identificação das espécies bacterianas e o desenvolvimento de um novo protocolo de estabelecimento *in vitro*. Outra opção é o uso de explantes advindos de plantas cultivadas *in vitro* que já estão livres de qualquer contaminante (LEIFERT, RITCHIE e WAITES, 1991).

Houve um baixo índice de contaminação fúngica nos explantes das três variedades não ultrapassando os 6% (Figura 4). Isso sugere que os fungos eram epífitos e que foram eliminados com uma desinfestação simples, baseada em etanol 70% e hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo (LEIFERT, RITCHIE e WAITES, 1991; PALU et al., 2011).

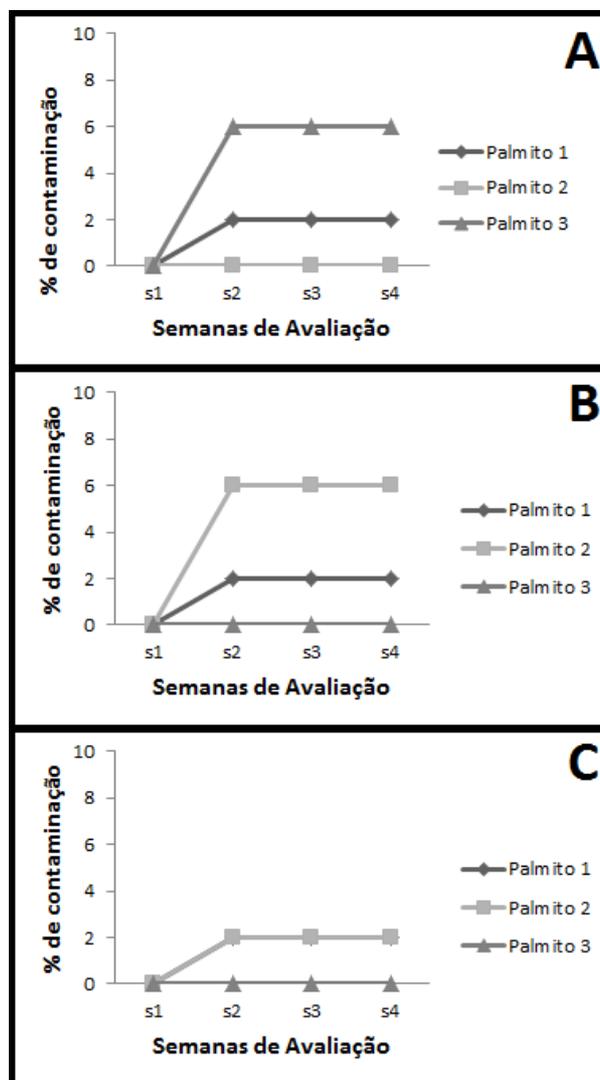


Figura 4: Percentual de contaminação fúngica nas variedades RB855156 (A), RB92579 (B) e RB867515 (C), sendo que cada linha representa os explantes de um mesmo palmito e S1, S2, S3 e S4, as avaliações de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente.

4.2. Pré-tratamento com solução antioxidante impede a oxidação instantânea causada pela excisão do explante

Verificou-se que a inoculação do explante é a fase mais crítica de oxidação, pois prejudica o estabelecimento *in vitro* do material (BASSAN et al., 2006). O explante oxidava-se no momento do corte, antes mesmo de ser inoculado no meio de cultivo (Figura 5A), e os que passaram pelo pré-tratamento de antioxidante não sofreram oxidação no momento da inoculação (Figura 5B) mostrando a eficiência do método.



Figura 5: Explantes recém inoculados em meio MS com PVP após a excisão com bisturi sem banho (A) e com banho em solução antioxidante (500 ppm de PVP) (B).

Os maiores níveis de explantes não oxidados ocorrem na primeira semana em todas as variedades. Ao longo das semanas, os explantes se oxidavam cada vez mais. Aos 28 dias, as variedades RB855156 e RB867515 não possuíam explantes não oxidados (Figura 6).

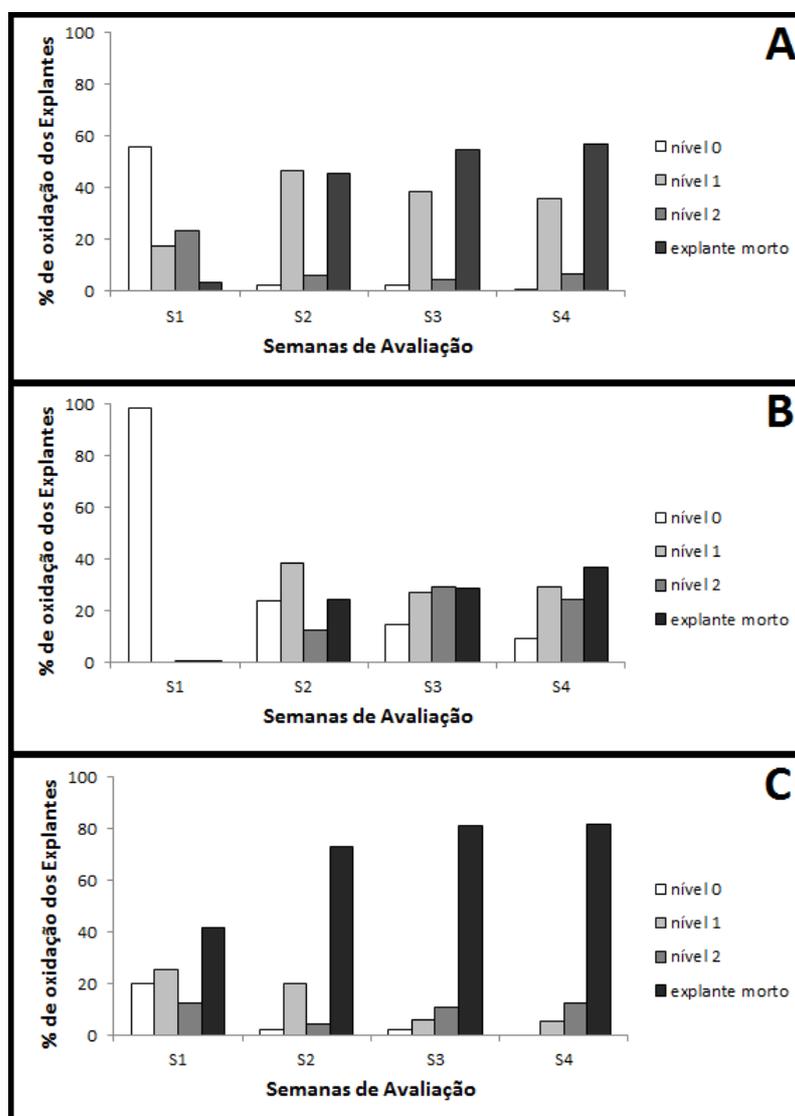


Figura 6: Nível de oxidação dos explantes das variedades RB855156 (A), RB92579 (B) e RB867515 (C). S1, S2, S3 e S4 representam as avaliações de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente.

Os explantes contaminados foram descartados e classificados como explante morto. Devido à contaminação endógena da variedade RB867515, a avaliação de oxidação foi prejudicada, uma vez que a contaminação do explante induz o aumento da oxidação (BRONDANI et al., 2003). Logo na

primeira semana 42% dos explantes estavam contaminados, chegando a 82% aos 28 dias.

Em diversas espécies, a oxidação tem sido relatada como prejudicial ao desenvolvimento *in vitro* de materiais vegetais quando se objetiva a micropropagação (BASSAN et al., 2006; CAMOLESI et al., 2007; MUDRY et al., 2013). Outros estudos em cana-de-açúcar também apontam grande perda de material devido a esse problema (MUDRY et al., 2013) o que prejudica a obtenção de calos em larga escala.

Houve formação de calos em 100% dos explantes inoculados para as três variedades, desconsiderando os explantes contaminados e com alta oxidação. A eficiência da calogênese também ocorreu em outras variedades de cana (JAHANGIR & NASIR, 2010; VAN DER VYVER et al., 2013; ALCANTARA et al., 2014). Portanto, a concentração de 2,4-D utilizada (3.0 mg.L^{-1}) foi eficiente para indução à calogênese nas variedades estudadas, necessitando apenas de ajustes relacionados à oxidação do material vegetal ao longo do cultivo.

4.3. Os diferentes tipos de calos identificados são morfológicamente idênticos nas variedades RB855156 e RB92579

As variedades RB855156 e RB92579 possuem três tipos de calos com o mesmo padrão morfológico e de desenvolvimento. No terceiro subcultivo (aos 84 dias), os diferentes tipos de calos puderam ser devidamente separados e identificados como: branco nodular compacto (BN), translúcido friável (TF) e mucilaginoso (M) (Figura 7).

O calo do tipo branco nodular apresenta uma cor esbranquiçada, células pequenas e de aspecto seco; formam nódulos compactos que se destacam facilmente do explante (Figura 7A). O calo tipo translúcido friável é translúcido de cor amarelada e possui aspecto seco; suas células são

relativamente maiores e friáveis entre si (Figura 7B). Já o calo do tipo mucilaginoso possui uma massa homogênea de coloração acinzentada, de aparência mucilaginosa e aspecto molhado e viscoso (Figura 7C). Outros autores também obtiveram resultados semelhantes no que se refere à caracterização morfológica dos calos (MALABAD et al., 2011; TAHIR, VICTOR e ABDULKADIR et al., 2011; DIBAX et al., 2013; SOARES et al., 2014), porém com algumas diferenças em relação à coloração. A divergência acontece devido à utilização de diferentes variedades, contudo, todos os trabalhos citam o calo nodular ou friável como sendo embriogênicos e regeneráveis. A maioria desses autores também descrevem o calo mucilaginoso como não-regenerável e, por isso, aconselham sua eliminação durante os subcultivos.



Figura 7: Três tipos de calos identificados: A- calo branco nodular compacto (BN); B- translúcido friável (TF); C- mucilaginoso (M).

O crescimento em volume do calo mucilaginoso é maior em comparação com os demais calos. Normalmente, o calo mucilaginoso foi observado na borda do explante, onde o nível de oxidação é maior. Explantes muito oxidados dificilmente apresentavam calo, mas quando se faziam presentes, eram do tipo mucilaginoso.

Quanto mais o calo cresce, mais água, nutrientes e reguladores do meio de cultura ele consome. O alto crescimento do calo mucilaginoso pode reduzir a taxa de crescimento dos outros tipos de calo. Sendo assim, ao diminuir o nível de oxidação, diminui-se também o aparecimento do calo

mucilaginoso, e isso aumentaria a disponibilidade de nutrientes para o maior crescimento dos calos do tipo BN e TF.

4.4. Os explantes retirados da base do palmito oxidam menos e o ácido cítrico foi o mais eficiente na função antioxidante

Ao longo do cultivo *in vitro*, a oxidação do explante ainda causou perda de material em todas as variedades. Verificou-se ainda que houve diferença entre a oxidação dos explantes retirados da parte basal e apical do palmito.

A oxidação aumenta conforme o explante se distancia da base do palmito (Figura 8). De acordo com Freitas et al. (2009), explantes jovens oxidam menos. Outro estudo com cana-de-açúcar mostrou que quanto maior a distância do meristema apical, menor a porcentagem de formação de calos embriogênicos nos explantes (HO & VASIL, 1983). Essa perda da capacidade de formação de calo embriogênico pode estar relacionada com o aumento da oxidação e com a diminuição da capacidade de desdiferenciação das células (NAGATA et al., 1994). Tecidos mais jovens também possuem uma elevada produção de auxina que, quando em altas concentrações, induzem a formação de calos (WERNER et al., 2009). Esses resultados mostram que se deve utilizar, preferencialmente, os explantes mais próximos do meristema apical.

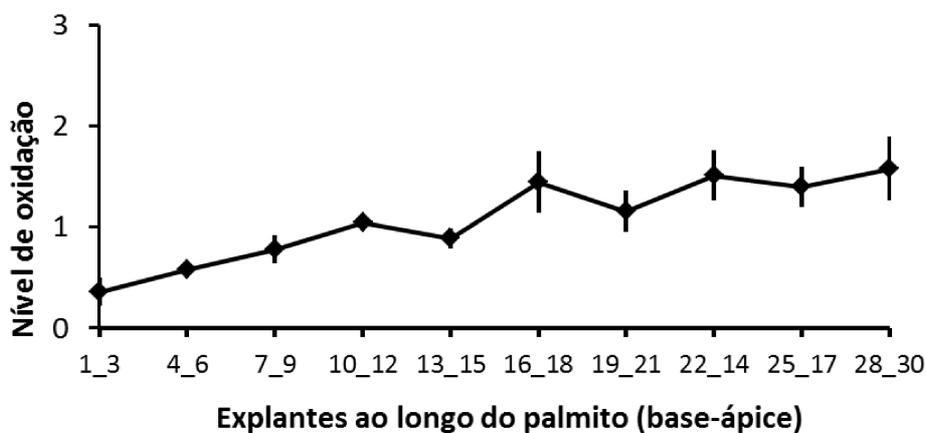


Figura 8: Médias da análise de variância referente à oxidação ocorrida ao longo do palmito (do explante 1 ao 30, sendo 1 o mais basal e o 30, o mais apical) da variedade RB92579.

Além dos compostos fenólicos causarem o escurecimento do material vegetal pela presença de substâncias como as quinonas (MISHRA et al., 2004), eles inibem o crescimento do explante (MELO et al., 2001) e estimulam a formação de calos não regeneráveis, conforme verificado nos experimentos. Alguns estudos relatam que fatores como a utilização de meio líquido, as condições de crescimento no escuro, a remoção das partes oxidadas do explante e a troca frequente do meio de cultivo podem diminuir do grau oxidativo do explante (MISHRA et al., 2004). Para estudos futuros, sugere-se a tentativa de crescimento do calo em meio líquido como suspensão celular para diminuir a oxidação e aumentar o crescimento do mesmo.

O teste com antioxidantes mostrou que os tratamentos com ácido cítrico apresentaram os menores índices de oxidação, sendo a concentração de $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ a melhor delas. O controle apresentou a maior oxidação em todo período de avaliação (Figura 9).

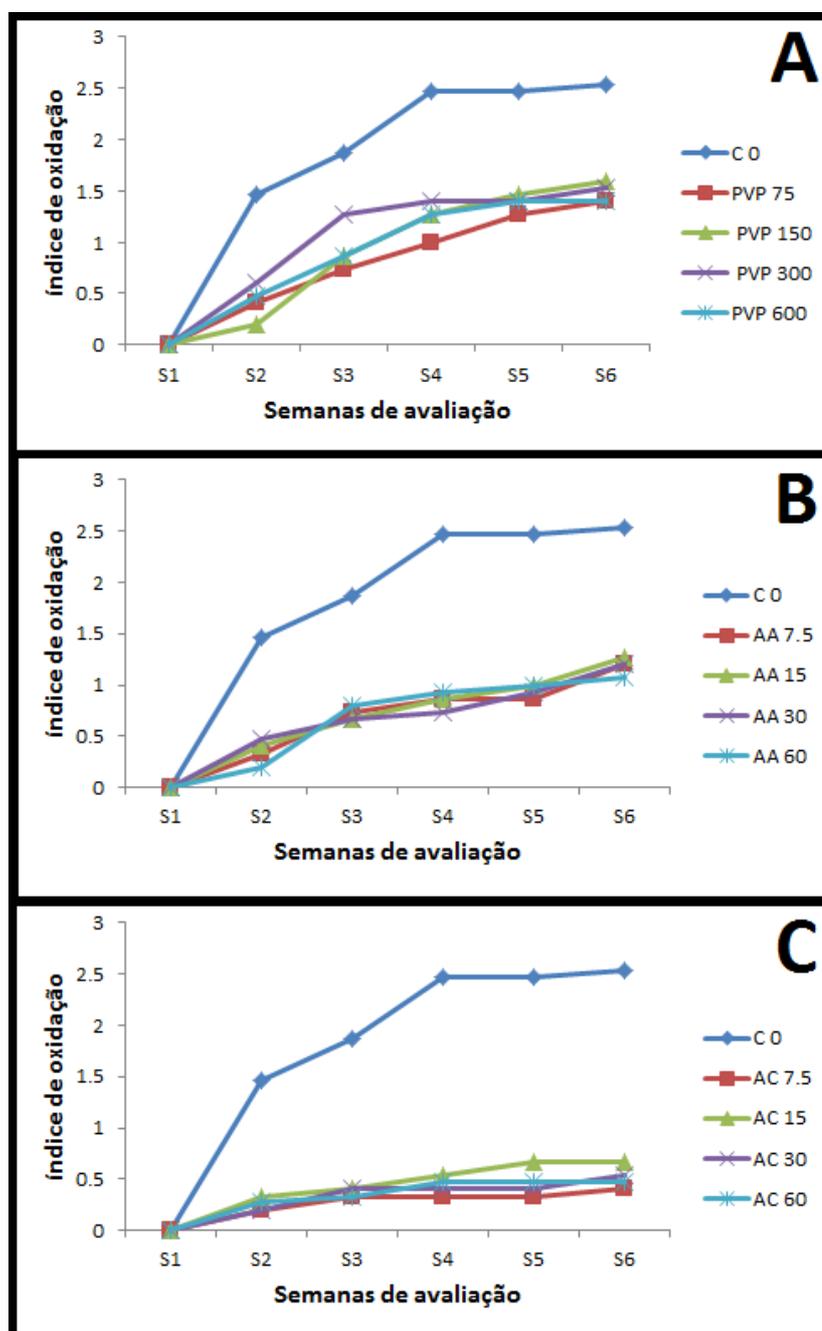


Figura 9: Índice de oxidação em função do uso de diferentes antioxidantes nos explantes da variedade RB92579: PVP (A), ácido ascórbico (B) e ácido cítrico (C) e suas respectivas concentrações representadas pelas linhas (em mg L^{-1}). C0 corresponde ao controle em A, B e C. S1, S2, S3, S4, S5 e S6 representam as avaliações de 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias, respectivamente.

O padrão de oxidação encontrado para cada antioxidante pode ser explicado pelo modo de ação de cada um deles. O PVP foi o antioxidante que apresentou os maiores níveis de oxidação, quando comparados ao controle. Ele atua complexando-se ao substrato oxidado (polifenóis) e tornando-o inativo (BORNEMAN, GTKMEN e NIJHUIS, 1997). Assim sendo, a oxidação não ocorrerá se houver PVP suficiente para inativar o substrato. Uma vez que ela ocorre, a tendência é de um aumento constante pelo esgotamento do PVP, conforme mostra a figura 9A.

O ácido ascórbico atua no centro de reação da polifenoloxidase, impedindo a oxidação dos polifenóis. Essa reação também depende das proporções de enzima ativa e substrato disponível (HE & LUO, 2007). Portanto, quando a quantidade de ácido ascórbico disponível para inativação da enzima não é suficiente, o nível de oxidação aumenta (Figura 9B).

O ácido cítrico possui uma atuação prolongada, uma vez que ele regula a oxidação por meio da diminuição do pH e a inativação das enzimas oxidantes (HE & LUO, 2007). Esse fato pode ser confirmado pela figura 9C, na qual os níveis de oxidação não apresentam uma tendência de aumento, variando seus índices de 0.32 a 0.57. As concentrações utilizadas apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,0001$), as quais interessantemente apontaram a concentração de 7.5 mg.L^{-1} como a mais eficiente.

4.5. Teste de Regeneração mostra que o potencial regenerativo dos calos diminui bruscamente ao longo dos subcultivos

Até o final do primeiro subcultivo (56 dias) não havia diferenciação morfológica suficiente para a separação dos diferentes tipos de calos. Aos 84 dias após a inoculação (final do R2), todos os eventos de regeneração dos calos tipo BN apresentaram brotos (Figura 10 e 11A). Nos calos do tipo TF a regeneração também foi alta (90% dos eventos com

brotos) (Figura 11B). Aos 112 dias, tanto os calos BN quanto TF tiveram uma queda brusca na taxa de regeneração (35% e 30% de eventos regenerados, respectivamente). Aos 140 dias, nenhum dos eventos de regeneração apresentou brotos.

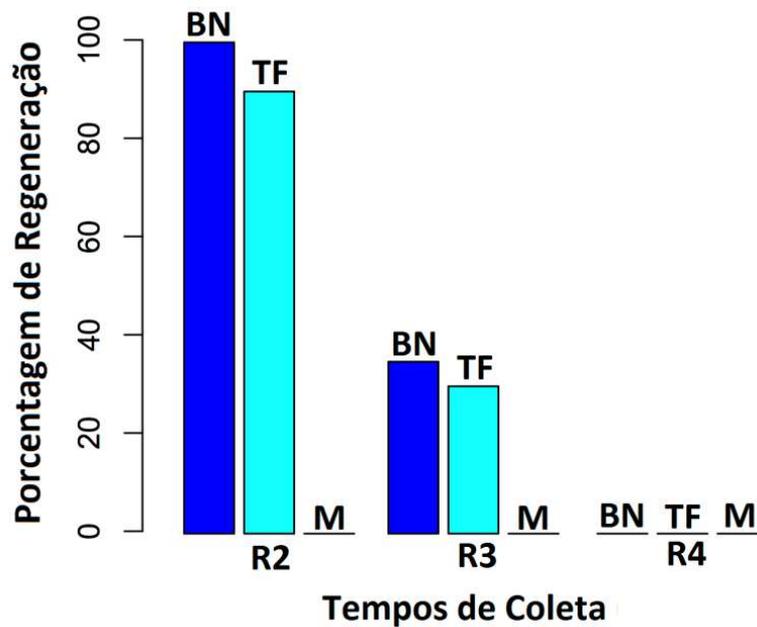


Figura 10: Porcentagem de eventos regenerados dos calos branco nodular (BN), translúcido friável (TF) e mucilaginoso (M) em diferentes subcultivos (R2: 84 dias; R3: 112 dias e R4: 140 dias).



Figura 11: Aspectos visuais dos calos tipo branco nodular (A), translúcido friável (B) e mucilaginoso (C), após 15 dias de exposição à luz em meio de regeneração (R2).

Em nenhum dos subcultivos os calos dos tipos M formaram algum tipo de brotação ou esverdeamento, demonstrando que não possui potencial regenerativo (Figura 11C). Resultados semelhantes foram descritos por outros autores para calos não embriogênicos (BASNAYAKE, MOYLE, BIRCH, 2011; MUDRY et al., 2013; ALCANTARA et al., 2014). Diversos estudos buscaram encontrar uma concentração ideal de um regulador de crescimento para melhor regenerar os calos em cana (RAZA et al., 2012; NAWAZ et al., 2013; DIBAX et al., 2013), porém os resultados obtidos mostram que a idade do calo é fator primordial para o sucesso da regeneração dos mesmos.

A capacidade de regeneração dos calos é muitas vezes associada à embriogênese somática. Muitos autores afirmam obter calos embriogênicos devido ao seu potencial de regeneração (BASNAYAKE, MOYLE, BIRCH, 2011; RAZA et al., 2012; NAWAZ et al., 2013), porém não apresentam nenhuma prova da real existência de embriões somáticos. Os calos obtidos no presente estudo comprovam que é possível a obtenção de uma plântula completa sem a necessidade de utilizar reguladores de crescimento a partir de calos organogênicos. Embora os resultados sejam consistentes, ainda existem poucos estudos sobre os aspectos estruturais ligados à morfologia e à histologia do calo embriogênico. Isso se deve à preferência dos autores por dados quantitativos na tentativa de estabelecer protocolos comerciais. As alterações histológicas ligadas às atividades das células regeneráveis são requisitos básicos no estudo de embriogênese somática (MACIEL et al., 2010).

A perda de capacidade de regeneração dos calos pode estar associada a diferentes fatores. A variação somaclonal é um fato recorrente na cultura de células (LEE & PHILLIPS, 1988), e os calos mantidos em subcultivo por período prolongado estão mais susceptíveis a tais alterações. Longos períodos de cultivo em altas concentrações de 2,4-D (3 mg L^{-1}) também podem diminuir a capacidade regenerativa dos calos (OROPEZA & GARCIA, 1996).

Durante o experimento, parte dos calos foram subcultivados em placas com meio de calogênese armazenadas no escuro durante 30 dias a partir do seu preparo a fim de verificar sua viabilidade. Interessantemente, após 28 dias, os calos estavam completamente ressecados e mortos. De acordo com Amarante Junior et al. (2002), a meia-vida do 2,4-D em meio aquoso é de duas a quatro semanas e é facilmente degradado em água e em exposição à luz. O 2,4-diclorofenol resultante dessa degradação pode ser tóxico para algumas plantas (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). No cultivo *in vitro*, tal toxicidade pode ser responsável pela perda da capacidade regenerativa.

Os resultados que envolvem a regeneração mostram a importância de se verificar os tempos ideais de subcultivo. Devem-se selecionar os materiais regeneráveis e possibilitar a eles uma maior quantidade de nutrientes no meio de cultivo, além de condições ideais de temperatura e fotoperíodo. Os calos do tipo BN e TF são potencialmente transformáveis devido ao elevado potencial regenerativo.

4.6. Existem diferenças estruturais entre os três tipos de calos e os brotos regenerados possuem origem organogênica

Os calos BN, TF e M possuem diferenças no que se refere a organização dos tecidos; tipo de tecido e de células; nutrição do calo; adesão ao explante; e ontogênese (Figura 12).

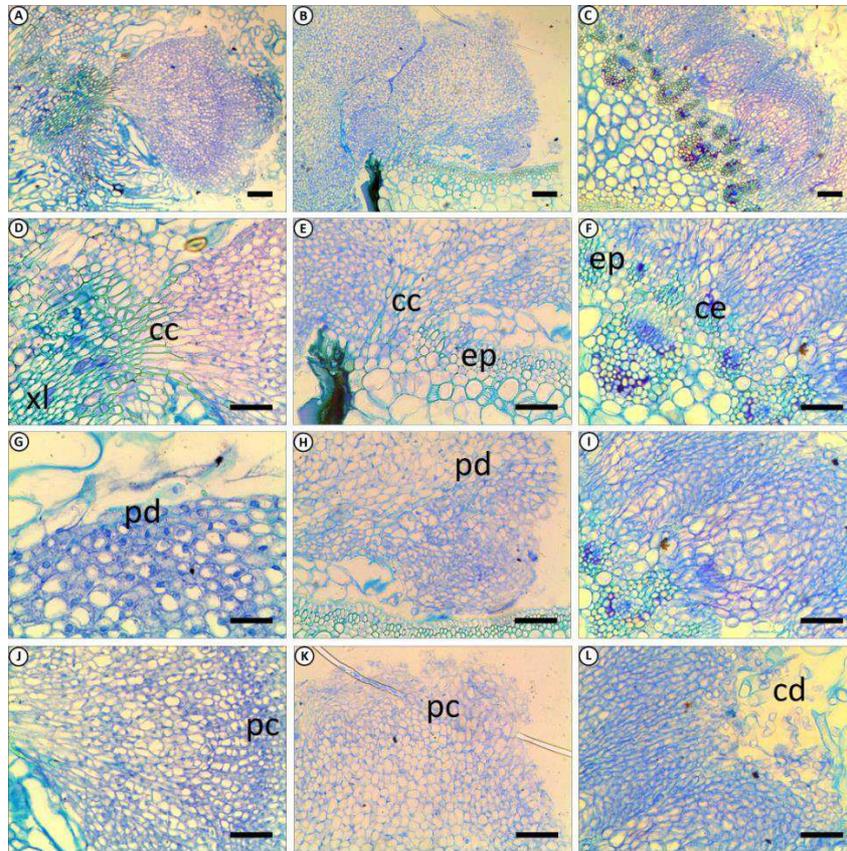


Figura 12: Diferenças estruturais entre os calos BN, TF e M (A, B e C, respectivamente) da variedade RB92579, em relação a: conexão com explante (D, E e F), protoderme (G, H e I), procâmbio e ápice calogênico (J, K e L). Legenda: xl= xilema do explante; cc= células de conexão; ep= epiderme do explante; ce= conexão com explante; pd= protoderme; pc= procâmbio; cd= células dispersas. Escala: barra A, B e C= 150 μ m; D, E, F, H, I, J, K e L = 100 μ m; G= 50 μ m.

O calo tipo BN é globular com uma base em formato de gargalo que faz conexão diretamente com o xilema do explante (Figura 12D). Essa conexão é feita por células alongadas que possuem função de transferência. Isso sugere que o calo BN tenha uma nutrição mais eficiente devido à maior possibilidade de absorção de nutrientes do meio (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & HAYASHI, 2004). As margens do calo BN são definidas por uma protoderme bem organizada, composta de células tabulares (Figura 12G). Na parte central do calo, existem células meristemáticas com núcleo

grande em relação ao citoplasma, indicando potencial de divisão celular (Figura 12J). A região do procâmbio encontra-se acima da região meristemática e suas células também possuem núcleo grande em relação ao citoplasma. É uma região mais escura, com um aglomerado celular, que indica alta taxa de divisão celular. Acima do procâmbio também existe uma protoderme delimitando o ápice do calo BN, diferentemente do encontrado nos outros tipos de calos (Figura 12J).

O calo do tipo TF também possui um formato globular, porém, com uma protoderme pouco organizada (Figura 12B e H). A conexão do calo é feita diretamente na epiderme do explante e suas células também são alongadas, porém mais curtas que em BN (Figura 12E). As células localizadas na parte central do calo possuem um núcleo menor em relação ao citoplasma, sendo seu potencial meristemático menor do que as equivalentes em BN. A região do procâmbio está localizada no ápice do calo e existe uma menor aglomeração celular em relação ao procâmbio de BN. Não há protoderme na parte apical do calo TF (Figura 12K).

O calo do tipo M possui estrutura ovalada com unidades muito próximas umas das outras, o que define o aspecto não friável desse calo (Figura 12C). Essa proximidade e a falta de protoderme nas estruturas faz com que elas não tenham delimitação definida (Figura 12I). Sua base possui ligação direta com a epiderme do explante, porém não existem células alongadas (Figura 12F). A parte central do calo possui células ovaladas com citoplasma grande e núcleo pequeno e pouco evidente, colocando em dúvida suas características meristemáticas (EVERT, 2006). É possível visualizar uma região de procâmbio com grande quantidade de células com núcleo grande e bastante evidente. No entanto, as células do ápice se dividem e dão origem às células cilíndricas alongadas que se soltam do calo e formam uma massa mucilaginosa (Figura 12L).

Comparando os resultados obtidos, verifica-se que existe uma relação entre a estrutura histológica e a regeneração dos calos. A complexidade de organização tecidual dos calos está diretamente ligada ao

seu potencial regenerativo: quanto maior seu nível de organização e estruturação, maior seu potencial regenerativo.

Em calos de *Pimpinella brachycarpa* também foram identificadas as diferenças anatômicas e morfológicas entre os tipos de calos. Nos calos não regeneráveis as células são cilíndricas, alongadas e sem conexão entre elas, ao passo que nos calos regeneráveis, estruturas nodulares, com um formato ovalado (NA et al., 2007). Ho & Vasil (1983) e Rodriguez et al. (1995) também identificaram esse padrão nos calos de outras variedades de cana-de-açúcar.

Existem poucos trabalhos publicados que relacionam a organogênese e/ou embriogênese somática à histologia dos calos em cana-de-açúcar (HO & VASIL, 1983; DIBAX et al., 2013; SOARES et al., 2014; ALCANTARA et al., 2014). Na maioria dos casos, a obtenção de calos embriogênicos e embriões somáticos é reportada com protocolos que utilizam a mesma concentração de 2,4-D (JAHANGIR & NASIR, 2010; VAN DER VYVER et al., 2013; SOARES et al., 2014). Entretanto, tais afirmações são feitas de forma subjetiva, ou seja, sem a comprovação da origem embriogênica do material regenerado. Embora em muitos casos seja possível diferenciar calos embriogênicos e não-embriogênicos, somente por características físicas e visuais, esse fato por si só não fornece informações completas sobre o aparecimento de embriões (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). A regeneração de um calo em uma planta completa (parte aérea e raiz) não comprova a presença de embriões, uma vez que a formação desses órgãos pode ser induzida pela adição de reguladores de crescimento ou pelo nível endógeno de fitormônios do explante (GOPITHA, BHAVANI e SENTHILMANICKAM, 2010).

Existem estágios de desenvolvimento característicos que antecedem a formação de um embrião como: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (EVERT, 2006; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). Segundo Zimmerman (1993), os estágios de desenvolvimento da embriogênese somática, similares aos da embriogênese zigótica, são considerados padrão

para o cultivo *in vitro*. No presente estudo não foi visualizado nenhum vestígio de estruturas pré-embriogênicas como fase globular escutelar e cotileoptilar, tipicamente encontrados em monocotiledôneas (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

Conforme descrito por Eichemberg e Scatena (2013), um embrião zigótico de *Paspalum* L. (Poaceae) possui coleóptilo, coleoriza, mesocótilo, plúmula, escutelo e radícula. Embriões somáticos de cana devem manter o mesmo padrão estrutural encontrado em sementes de cana ou outra Poaceae, pois são estruturas muito conservadas nas espécies pertencentes à família (GPWG, 2001). O escutelo e a coifa podem ser menos desenvolvidos, pois suas funções de absorção e proteção, respectivamente, são pouco necessárias nas condições de cultivo *in vitro*.

Os brotos regenerados a partir dos calos de cana-açúcar, variedade RB92579, possuem origem organogênica, a qual é comprovada através de análises histológicas ao longo de seu desenvolvimento (Figura 13). Pode-se visualizar a formação de regiões meristemáticas nos calos regeneráveis antes mesmo de submetê-los às condições de regeneração (Figura 13A). O ponto meristemático está completamente envolto por massa calogênica e claramente ligado a ela, não deixando dúvidas quanto à origem. O xilema que aparece na figura 13A é outro indício de que o calo está nutrindo esse ponto meristemático, uma vez que ele não possui sistema radicular. Em um maior aumento (Figura 13C), nota-se a presença da túnica (duas camadas de células com divisões anticliniais) e do corpo (abaixo da túnica, com três camadas de células com divisões pericliniais), característicos de meristemas apicais (EVERT, 2006).

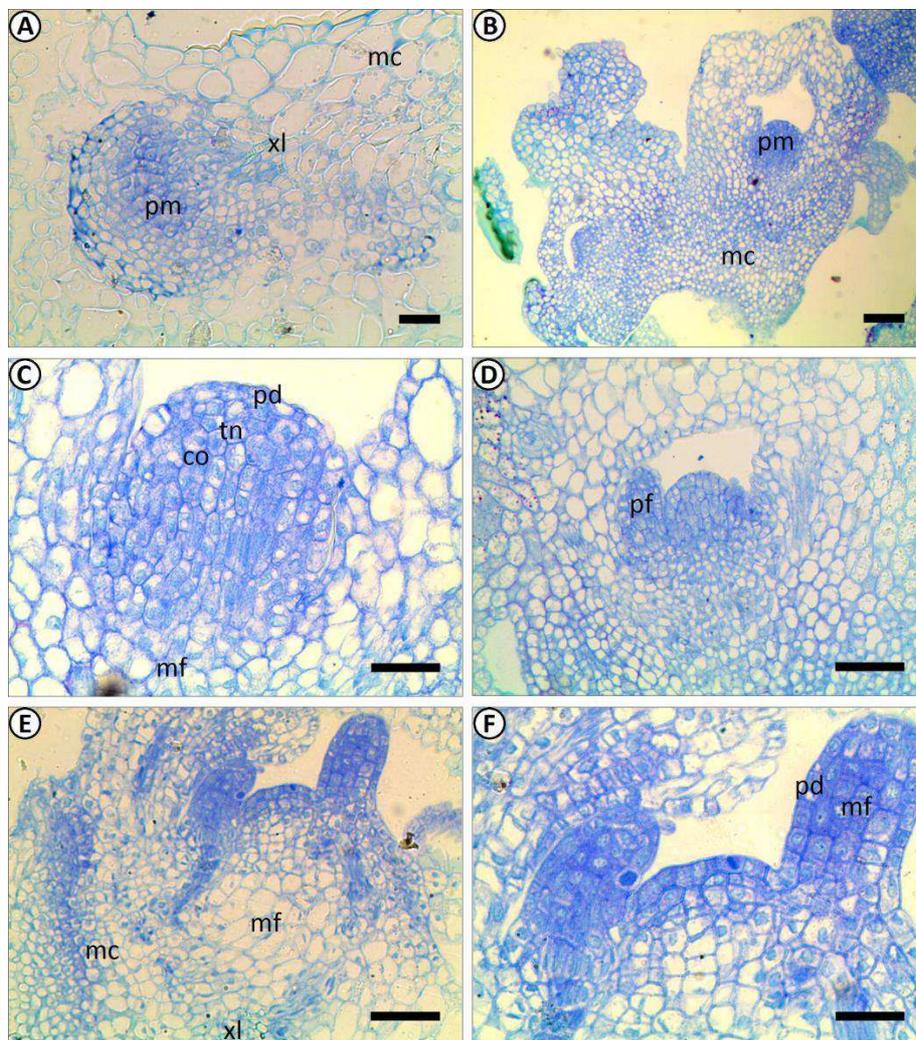


Figura 13: Organogênese com desenvolvimento de broto em calos da variedade RB92579. Legenda: xl= xilema; pm= ponto meristemático; mc= massa calogênica; pd= protoderme; tn= células da tûncia; co= células do corpo; mf= meristema fundamental; pf= primórdio foliar. Escala: barra A, D e E= 100 µm; B= 150 µm; C e F = 50 µm.

Os brotos apresentaram primórdios foliares com protoderme e meristema fundamental após sete dias de exposição à luz (Figura 13D). Com o desenvolvimento do broto, houve o aparecimento de outros primórdios foliares dispostos alternadamente, como esperado para a espécie (Figura

13E). Na mesma figura, podemos visualizar a presença de meristema fundamental e células xilêmicas da massa calogênica, as quais nutrem o crescimento desse broto através de células do procâmbio. Em nenhum dos cortes foi visualizado qualquer célula ou tecido do sistema radicular ligado ao polo oposto do meristema apical.

Houve um intenso enraizamento dos brotos regenerados após algumas semanas em meio de regeneração, sem a adição de qualquer substância ou regulador de crescimento ao meio de cultivo (Figura 14B).

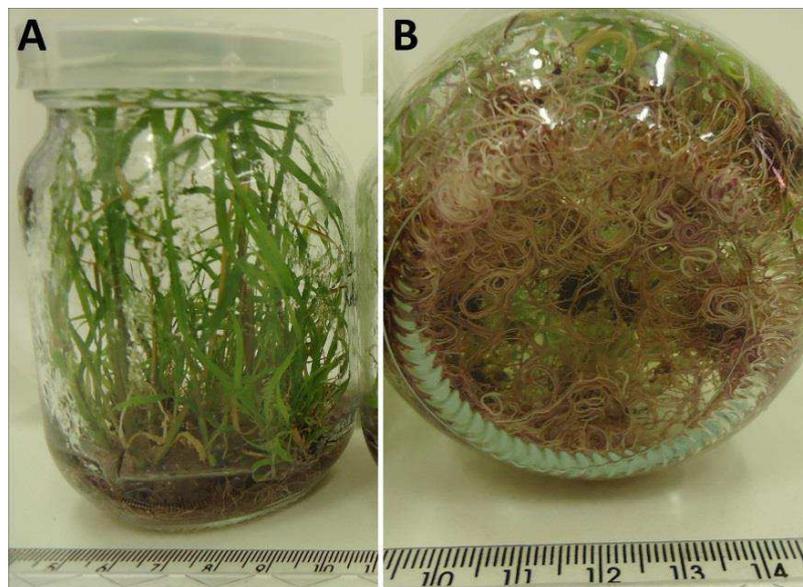


Figura 14: Plântulas da variedade RB92579 após 90 dias em meio de regeneração (A), e com formação de raízes (B).

As raízes adventícias em monocotiledôneas geralmente possuem origem endógena, sendo formadas diretamente da parte aérea, caule ou do mesocótilo em gramíneas (SOUZA & PEREIRA, 2007). Como foram visualizadas somente após o desenvolvimento completo dos brotos, fica evidente que as raízes não foram formadas a partir do desenvolvimento do polo radicular embrionário.

5. CONCLUSÕES

A calogênese das variedades RB855156 e RB92579 foi induzida com eficiência utilizando meio MS suplementado com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D.

O excesso de oxidação prejudica a formação de calos regeneráveis de cana-de-açúcar. A utilização de antioxidante somente no meio de cultivo não foi suficiente para evitar a oxidação. O uso da solução de ácido cítrico a $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ como pré-tratamento dos explantes foi essencial para a minimização do problema.

Os calos do tipo branco nodular (BN) e translúcido friável (TF) possuem alto potencial regenerativo e por isso são potencialmente transformáveis. O calo do tipo mucilaginoso (M) não se regenera.

Existem diferenças estruturais entre os calos BN, TF e M, sendo o calo BN o mais complexo em relação à organização dos tecidos e tipos de células.

Os brotos dos calos do tipo BN e TF da variedade RB92579 são de origem organogênica, comprovada por análises histológicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, G. B.; DIBAX, R.; OLIVEIRA, R. A.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DAROS, E. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 1, p. 63-72, 2014.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Revisão das propriedades, usos e legislação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Cadernos de Pesquisa**, v. 13, n. 1, p. 60-70, 2002.

ANDRADE, J. S. C. O.; OLIVEIRA, F. J.; FILHO, C. J. A.; MELO, L. J. O. T.; REIS, O. V. Avaliação de progênies em famílias RB na fase inicial do melhoramento genético em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 4, p. 609-616, 2011.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. e HAYASHI, A. H. Anatomia dos Órgãos Vegetais: Raiz. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. E; CARMELO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa, UFV. 2004. p. 438.

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

ATTIA, A. O.; MOHAMED, A. M.; HAFEZ, A. M.; SADIK, A. S.; ABDELALLAH, A. N. Establishment of regeneration and transformation Systems of f144 sugarcane cultivar. **Pak. J. Biotechnol**, v. 2, n. 1, p. 15-18, 2005.

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

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 48, p. 297–326, 1997.

BORNEMAN, Z.; GTKMEN, V.; NIJHUIS, H. H. Selective removal of polyphenols and brown colour in apple juices using PES/PVP membranes in a single-ultrafiltration process. **Journal of Membrane Science**, v. 134, p. 191-197, 1997.

BRONDANI, D. J.; FILHO, A. A. S.; LEITE, A. C. L.; NASCIMENTO, C. R. M.; NETO, P. J. R.; BIEBER, L. W. Síntese e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Análogos da Primina 5 e 6 Alquil. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 22, n. 3, p. 217-221, 2003.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1998. p.533-568.

CAMOLESI, M. R.; KAIHARA, E. S.; SACONI, C. G.; FARIA, R. T.; NEVES, C. S. V. N. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira maçã. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, 2007.

CARVALHO, S. A. D.; FURTADO, A. T.. O melhoramento genético de cana-de-açúcar no Brasil e o desafio das mudanças climáticas globais. **Gestão & Conexões - Management and Connections Journal**, v. 2, n. 1, p. 22-46, 2013.

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

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 e Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

CONAB (CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-açúcar (Safra 2014/2015)**, Segundo Levantamento, 2014. 28p.

DIBAX, R.; ALCANTARA, G. B.; MACHADO, M. P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; OLIVEIRA, R. A. Protocol optimization and histological analysis of *in vitro* plant regeneration of 'RB92579' and 'RB93509' sugarcane cultivars. **Ciência Rural**, v. 43, n. 1, 2013.

EICHEMBERG, M. T.; SCATENA, V. L. Morphology and anatomy of the diaspores and seedling of *Paspalum* (Poaceae, Poales). **An Acad Bras Cienc**, v. 85, n. 4, 2013.

EVERT, R. F. **Esau's Plant Anatomy, Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: their Structure, Function, and Development**. 3.ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2006. 601 p.

FANG, J. Y.; HSU, Y. R. Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micropropagated *Aglaonema* cultures. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, v. 110, p. 53–62, 2012.

FREITAS, R. M. O.; OLIVEIRA, M. K.T.; DOMBROSKI, J. L. D.; CÂMARA, F. A. A.; SILVA NETO, R. V. Efeito dos tratamentos de oxidação em *Aloysia virgata*. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 151-154, 2009.

GOPITHA, K.; BHAVANI A. L.; SENTHILMANICKAM, J. Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, n. 3, 2010.

GPWG - GRASS PHYLOGENY WORKING GROUP. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 8, n. 8, p. 373-457, 2001.

HE, Q.; LUO, Y. Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce. **Stewart Postharvest**, v. 6, n. 3, 2007.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Population biology and epidemiology of pseudomonas Syringae. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 28, p. 55-77, 1990.

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

JADOSKI, C. J.; TOPPA, E. V. B.; JULIANETTI, J.; HULSHOF, T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, v. 3, n. 2, 2010.

JAHANGIR, G. Z.; NASIR, I, A.; SIAL, R. A.; JAVID, M. A.; HUSNAIN, T. Various hormonal supplementations activate sugarcane regeneration *in vitro*, **Journal of Agricultural Science**, v. 2, n. 4; 2010.

JIMTHA, J. C.; SMITHA, P. J.; ANISHA, C.; DEEPTHI, T.; MEEKHA, G.; RADHAKRISHNAN, E. K.; GAYATRI, G. P.; REMAKANTHAN, A. Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 118, p. 57–66, 2014.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review ‘sugarcane Biotechnology: the challenges and opportunities,’ *In vitro cell. Dev. Biol. Plant*, 41(4):345–363; 2005. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**, v. 42, p. 201–205, 2006.

LEE, M.; PHILLIPS R. L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 39, p. 413-37, 1988.

LEIFERT, C.; RITCHIE, J.Y.; WAITES, W.M. Contaminants of plant-tissue and cell cultures **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 452-469, 1991

LEITE, G. H. P.; CRUSCIOL, C. A. C.; SILVA, M. A.; FILHO, W. G. V. Reguladores vegetais e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1843-1850, 2008.

LIMA, M. A. C.; GARCIA, R. O.; MARTINS, G. S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 73-77, 2001.

LOREDO-CARRILLO, S. E.; SANTOS-DÍAZ, M. D.; LEYVA, E.; SANTOS-DÍAZ, M. S. Establishment of callus from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers and effect of abiotic stress on flavonoids and sterols accumulation. **J. Plant Biochem. Biotechnol.**, v. 22, n. 3, p. 312–318, 2013.

MACIEL, S. S.; FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SILVA, R. A. SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 263-267, 2010.

MALABADI, R. B.; MULGUND, G. S.; NATARAJA, K.; KUMAR, S. V. Induction of somatic embryogenesis in different varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Research in Plant Biology**, v. 1, n. 4, p. 39-48, 2011.

MARIN, F. & NASSIF, D. S. P. Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 17, n. 2, p. 232–239, 2013.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guaribeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 1301-1306, 2001.

MISHRA, P.; DATTA, S. K.; JOHRI, J. K.; SINGH, H. B.; SRIVASTAVA, A. An improved method *in vitro* large scale propagation of *Piper betle* L. **J. Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 13, p. 161–164, 2004.

MONACO, L. C.; SONDAHL, M. R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R. Applications of tissue culture in the improvement of coffee In:

REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag. 1977. p.109-129.

MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. **Sugarcane: Physiology, Biochemistry & Functional Biology**. 1.ed. New Delhi: John Wiley & Sons, Inc. 2014. 716 p.

MUDRY, C. S.; SOUZA, D. K. K.; DIBAX, R.; ALCÂNTARA, G. B.; BESPALHOK FILHO, J. C. Embriogênese somática da cultivar RB966928 e do clone RB986419 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1023-1032, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol**, v. 15, p. 473-479, 1962.

NA, H.; KIM, K. W.; KWACK, Y.; KIM, S. K.; CHUN, C. Comparative anatomy of embryogenic and non-embryogenic calli from *Pimpinella brachycarpa*. **Journal of Plant Biology**, v. 50, p. 344-350, 2007.

NAGATA, T. ISHIDA, S.; HASEZAWA, S. TAKAHASHI, Y. Genes involved in the dedifferentiation of plant cells. **Int. J. Dev Biol.**, v. 38, p. 321-327, 1994.

NAWAZ, M.; ULLAH, I.; IQBAL, N.; IQBAL, M. Z.; JAVED, M. A. Improving *in vitro* leaf disk regeneration system of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) with concurrent shoot/root induction from somatic embryos . **Turk J Biol**, v. 37, p. 726-732, 2013.

NEWELL, C. A. Plant transformation technology: developments and applications. **Molecular Biotechnology**, v. 16, 2000.

NORTH, J. J.; NDAKIDEMI, P. A.; LAUBSCHER, C.P. The potential of developing an *in vitro* method for propagating *Strelitziaceae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 45, p. 7583-7588, 2010.

OROPEZA, M.; GUEVARA, P.; DE GARCFA, E.; RAMFREZ, J. L. Identification of somaclonal variants of sugarcane (*Saccharum* spp.) resistant

to sugarcane mosaic virus via RAPD markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 13, n. 2, p. 182-191, 1995.

PALU, E. G.; CORREA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Use of antibiotics for the control of endogenous bacteria aiming the micropropagation of fig trees. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 587-592, 2011.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. D. Identification and antibiotic control of endophytic bacteria contaminants in micropropagated potato explants. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.86, p. 285–301, 2006.

RAZA, S.; QAMARUNISA, S.; HUSSAIN, M.; JAMIL, I.; ANJUM, S.; AZHAR, A.; QURESHI, J. A. Regeneration in sugarcane via somatic embryogenesis and genomic instability in regenerated plants. **J. Crop Sci. Biotech.**, v. 15, n. 2, P. 131-136, 2012.

RIDESA. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Curitiba, 2010. 137p.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

RODRIGUEZ, S.; MONDEJAR, C.; RAMOS, M. E.; DIAZ, E.; MARIBONA, R.; ANCHETA, O. Sugarcane somatic embryogenesis: a scanning electron microscopy study. **Tissue & Cell**, v. 28, n. 2, p. 149-154, 1995.

SANTOSA, D. A.; HENDROKO, R.; FAROUK, A.; GREINER, R. A Rapid and Highly Efficient Method for Transformation of Sugarcane Callus. **Molecular Biotechnology**, v. 28, p. 113-119, 2004.

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do jacarandá da Bahia. **Biosci. J.**, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas Silvestres e cultivadas. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 2, p. 151-157, 2004.

SILVA, M. A.; GONÇALVES, P. S. Inbreeding in sugarcane varieties. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p. 580-586, 2011.

SIQUEIRA, E. R.; INOUE, M. T. Controle de oxidação na cultura de tecidos de coqueiro. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 7, p. 949-953, 1991.

SOARES, R. R.; FERREIRA, E. M.; GAMARANO, C. M.; RIBEIRO, C. R.; SABINO, M. V.; PEREIRA, M. H. B. The use of histological analysis for the detection of somatic embryos in sugarcane. **Afr. J. Biotechnol**, v. 13, n. 6, p. 762-767, 2014.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2003.

TAHIR, S. M.; VICTOR, K.; ABDULKADIR S. The effect of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) concentration on callus induction in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Nigerian Journal of Basic and Applied Science**, v. 19, n. 2, p. 213-217, 2011.

THOMAS, P. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. **Current Science**, v. 87, n. 1, p. 67-72, 10 2004.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J.; JULIANETTI, A.; HULSHOF, T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. R. Aspectos da fisiologia de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum Officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, v. 3, n. 3, 2010.

UNICA. União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Relatório de Sustentabilidade**. União da Indústria de Cana-de-açúcar, São Paulo-SP. 2010. p. 71.

VAN DER VYVER, C.; CONRADIE, T.; KOSSMANN, J.; LLOYD, J. *In vitro* selection of transgenic sugarcane callus utilizing a plant gene encoding a mutant form of acetolactate synthase. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant**, v. 49, p. 198–206, 2013.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S.; SELVARAJ, N. *In vitro* propagation of Acacia species. **Plant Science**, v. 163, p. 663-671, 2002.

WERNER, E. T.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. Controle da calogênese do Pau-Brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

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

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.