



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
ANDRÉ LUÍS DE FRANÇA DIAS



**PERFIL FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE TRÊS VARIEDADES DE CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO**

RECIFE, PE
FEVEREIRO, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
ANDRÉ LUÍS DE FRANÇA DIAS

**PERFIL FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE TRÊS VARIEDADES DE CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

ORIENTADORA:

Dra. Terezinha Rangel Camara

CO-ORIENTADOR:

Dr. Arnóbio Gonçalves de Andrade

RECIFE, PE
FEVEREIRO, 2014

ANDRÉ LUÍS DE FRANÇA DIAS

**PERFIL FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE VARIEDADES DE CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Dissertação defendida e aprovada em: _____ de _____ de _____.

Orientadora:

Prof. Dra. Terezinha Rangel Camara
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Examinadores:

Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Lilia Willadino
Universidade Federal Rural da Pernambuco

Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Suplente:

Prof. Dra. Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

**RECIFE, PE
FEVEREIRO, 2014**

Dedico aos meus pais,

por toda atenção, empenho, amor, ensinamentos
de respeito ao próximo e dignidade.

Faço deste trabalho uma singela
homenagem como forma de
gradidão por tudo que sei e sou.
Certamente sem vocês, essa conquista
teria sido mais difícil ou inexistido.

Obrigado, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelo seu amor incondicional, pela minha saúde e, sobretudo, pela sua presença em minha vida.

À minha mãe, Jôzi, e ao meu pai, Paulo, pelos ensinamentos, dedicação, paciência, repreensões, orações, etc. Foram imprescindíveis para a minha formação pessoal e profissional. Sou grato, também, a minha querida e admirada irmã, Juliana, pela nossa boa amizade e parceria.

À Aline, que sempre esteve do meu lado, sendo tão carinhosa, compreensiva e dedicada.

À minha querida orientadora, Profa. Terezinha Camara, que me acolheu e apoiou num momento tão delicado, oferecendo-me tantos ensinamentos, incentivos e responsabilidades. Tudo isso num astral positivo e contagiante. Muito obrigado, mesmo!

Ao excelente pesquisador Francisco Pompelli, por ter me aceitado como orientando, pelos ensinamentos e contribuições na minha formação profissional.

Às Professoras Cláudia Ulisses e Lilia Willadino pelas valiosas colaborações e amizade, completando o time de excelência do laboratório (LCTV) em conhecimentos, gentileza e alegria na convivência e no trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco representado pela coordenadora Dra. Carmem Zickel que, em especial, não mediu esforços para que, burocraticamente, eu pudesse continuar o curso de mestrado. Serei eternamente grato. A Kênia Muniz, sempre tão prestativa e dedicada na tarefa de auxiliar em tudo que precisei.

Aos meus companheiros de turma da pós-graduação, pela convivência, troca de conhecimentos, experiências e pelas várias maratonas árduas de disciplinas, apresentações, etc. Além das alegrias compartilhadas por cada etapa alcançada. Muito obrigado pela amizade.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao CETENE, representado pelo Diretor Dr. André Galembeck, pela Coordenação de Tecnologias, Roberta Medeiros e Lygia Brito, que desde o início foram facilitadores e incentivadores desse meu crescimento acadêmico.

À Michelle Marrie, que foi a peça inicial fundamental para que eu pudesse dar o primeiro passo dessa trajetória. Obrigado por tudo e pela sua amizade. Nunca esquecerei os anos em que convivemos no CETENE.

Aos estagiários e bolsistas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pelos momentos de trabalho, crescimento e muita descontração: Gemima, Marta, Liliana, Carla, Mayza, Marciana, Luciana, Ronaldo, Arquimedes, Marina, Laís, Felipe e Rodolfo.

Ao técnico do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Francisco Wellington, pela receptividade, amizade e ensinamentos.

À Profa. Emília Arruda e à Natalia Corte que me ajudaram com extremíssima boa vontade, dando-me livre acesso ao laboratório de anatomia vegetal, bem como, todas as instruções técnicas que culminaram nos excelentes e elogiados cortes histológicos.

Aos amigos do início da caminhada científica, aqueles da graduação de Bacharelado em Ciências Biológicas pela UPE (Universidade de Pernambuco): André, Clara, João, Kena, Reby, Robson, Rodrigo, Sura e Tati. Pessoas muito especiais que Deus me presenteou e os terei como amigos para o resto dessa existência, e além dela.

Aos meus eternos mestres de biofábrica que fizeram ou fazem parte do meu crescimento: Andréa Baltar, Emmanuel Cabral, Deivid Costa, Odemar Reis, Arnóbio Andrade e Barbosa Cabral (cronologicamente).

Aos meus amigos de trabalho, Gessiane Borrelly e Lucimário Corrêa, que dividem os problemas e alegrias no ambiente profissional. Certamente, fizeram muito por mim, auxiliando em tudo o que precisei para que cada etapa desse processo pudesse ser alcançada.

Aos auxiliares de produção da biofábrica, que são meus amigos, professores, irmãos e parceiros, que me ajudaram, de enorme boa vontade e com muita alegria.

Ao corpo de técnicos e pesquisadores do CETENE que sempre contribuíram nos meus trabalhos científicos e laboratoriais: Laureen, Samantha, Robson, Aldenise, Lindomar, Andrezza, Isaac, Joana, Gaby, Josi e Ceça.

Diversas pessoas envolveram-se neste trabalho, seja cientificamente, operacionalmente, como também, psicologicamente, quando me deram forças para que eu não desistisse diante das dificuldades. Sem esquecer aqueles que dividiram alegrias e gargalhadas. Cada um a sua maneira e a seu momento, para que no fim desse percurso, tudo saísse bem.

Eternamente grato a todos!

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO GERAL	ix
1 - INTRODUÇÃO	12
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Características gerais da cana-de-açúcar	13
2.2 Cultura de tecidos de plantas	16
2.3 Aclimatização	18
2.4 O estresse	20
3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
4 - MANUSCRITO	29
Aclimatização de variedades de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.) em distintos volumes de substrato: biometria e sistema antioxidativo	29
RESUMO	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
CONCLUSÕES	45
AGRADECIMENTOS	45
REFERÊNCIAS	45
5 – ANEXOS	55

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

ACLIMATIZAÇÃO DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR EM DISTINTOS VOLUMES DE SUBSTRATO: BIOMETRIA E SISTEMA ANTIOXIDATIVO

Tabela 1. Caracterização da intensidade luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) nos três ambientes da aclimatização (sombrite 70%, plástico e sol pleno).....	49
Tabela 2. Altura média das plantas (AP) e número médio de folhas de mudas (NF) das variedades de cana-de-açúcar RB931011, RB92579 e RB98710, aos 15, 30 e 45 dias de aclimatização em diferentes volumes de substrato (55 cm^3 e 95 cm^3).....	50
Tabela 3. Massa seca total das plantas micropropagadas (MSt), massa seca da parte aérea (MSa), massa seca radicular (MSr), área foliar (AF) e coeficiente hídrico relativo (CHR) das variedades de cana-de-açúcar (RB931011, RB92579 e RB98710) aos 45 dias de aclimatização em diferentes volumes de substrato (55 cm^3 e 95 cm^3).....	51
Tabela 4. Densidade estomática (mm^2) dos segmentos foliares das variedades de cana-de-açúcar (RB931011, RB92579 e RB98710) sob cultivo <i>in vitro</i> e aos 15, 30 e 45 dias de aclimatização em diferentes volumes de substrato (55 cm^3 e 95 cm^3).....	52
Tabela 5. Teores de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em variedades de cana-de-açúcar (RB931011, RB92579 e RB98710) <i>in vitro</i> e aos 45 dias de aclimatização em diferentes volumes de substrato (55 cm^3 e 95 cm^3).....	53
Tabela 6. Atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em variedades de cana-de-açúcar (RB931011, RB92579 e RB98710) <i>in vitro</i> e aos 45 dias de aclimatização em diferentes volumes de substrato (55 cm^3 e 95 cm^3).....	54

LISTA DE FIGURAS**PERFIL FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE TRÊS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO**

Figura 01. Biorreator de Imersão Temporária (BIT) modelo em plástico PET de 5L utilizados no CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste) contendo uma das três variedades de cana-de-açúcar adotadas no experimento.....17

RESUMO GERAL

A cultura da cana-de-açúcar tem destaque no Brasil por contribuir consideravelmente com a economia. A micropropagação é uma ferramenta da cultura de tecidos de plantas para produção de plantas em larga escala geneticamente idênticas à planta mãe, em um tempo relativamente curto em comparação com a propagação convencional, em condições ambientais, assépticas e controladas. A fase de aclimatização é considerada crítica pelas grandes perdas do material micropropagado, causada pela mudança de ambiente das plantas do laboratório para as estufas e casas de vegetação. Objetivou-se avaliar mudas de cana-de-açúcar das variedades RB931011, RB92579 e RB98710 em diferentes condições de aclimatização. Essas variedades foram micropropagadas em biorreator de imersão temporária (BIT) e aclimatizadas em estufa cujo material estrutural de cobertura era constituído de plástico leitoso (PL), sendo metade da área coberta em associação à malha de sombreamento (MS) preta (70% de sombreamento). As plantas foram submetidas a sol pleno (SP), após 30 dias em estufa. O período de aclimatização sob PL e MS foi de 15 dias. As três variedades foram plantadas no substrato Carolina Soil[®] nos volumes de 55 cm³ e 95 cm³, estabelecendo-se os seguintes tratamentos: T1 (RB931011 – 55 cm³), T2 (RB931011 – 95 cm³), T3 (RB92579 – 55 cm³), T4 (RB92579 – 95 cm³), T5 (RB98710 – 55 cm³) e T6 (RB98710 – 95 cm³). A cada 15 dias foram avaliados: número de folhas (NF), altura da planta (AP) e porcentagem de plantas com perfilhos (% P). Ao final do período experimental determinaram-se: massa seca da parte aérea (MSa) e das raízes (MSr), porcentagem de sobrevivência (S%), área foliar (AF), teor relativo de água (CHR), densidade estomática, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), teor do aldeído malônico (MDA) e de peróxido de hidrogênio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um fatorial 2x3, com 20 repetições. Cada repetição foi representada por uma planta por tubete. As variedades RB92579 e RB98710 apresentaram mais robustez atingindo as maiores médias biométricas e maior taxa de sobrevivência na aclimatização. O maior volume de substrato proporcionou maior média de altura, peso da matéria seca, área foliar e menor atividade da SOD aos 45 dias de aclimatização, destacando-se na influência da redução e equilíbrio do estresse nas mudas. O volume de substrato de 95 cm³ é o mais indicado para a aclimatização e produção de mudas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum*, biomassa, perfilhamento, área foliar, conteúdo hídrico, peróxido de hidrogênio, superóxido dismutase.

ABSTRACT

The cultivation of sugarcane in Brazil has notoriety for contributing significantly to the economy. The micropropagation is a tool for tissue culture plants to produce on a large scale genetically identical to the mother plant in a relatively short time compared with the conventional spread, environmental, and controlled aseptic conditions. The acclimatization stage is considered critical by large losses of micropropagated material, caused by the changing environment of the laboratory plants for greenhouses. Objective was to evaluate plants of varieties sugarcane RB931011 , RB92579 and RB98710 in different acclimatization conditions. These varieties were micropropagated in temporary immersion bioreactor (BIT) and acclimatized in a greenhouse whose structural roofing material consisted of milky plastic (PL), half of the area covered in association with black mesh shade (MS) (70% shading). The plants were subjected to full sun (SP), after 30 days in the greenhouse. The acclimatization period under PL and MS was 15 days. The three varieties were planted in the substrate Carolina Soil[®] in volumes of 55 cm³ and 95 cm³, establishing the following treatments : T1 (RB931011 - 55 cm³), T2 (RB931011 - 95 cm³), T3 (RB92579 - 55 cm³), T4 (RB92579 - 95 cm³), T5 (RB98710 - 55 cm³) and T6 (RB98710 - 95 cm³). Every 15 days were evaluated: number of leaves (NF), plant height (AP) and percentage of plants with tillers (% P). At the end of the experimental period were determined: dry shoot weight (MSa) and roots (MSr), percentage of survival (S%), leaf area (AF), high water content (CHR), stomatal density, activity of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT), content of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide. The experimental design was completely randomized in a 2x3 factorial design with 20 replications. Each replicate was represented by one plant per pot. The RB92579 and RB98710 varieties showed more robustness reaching the largest biometric medium and higher survival rate in the acclimatization. The largest volume of substrate provided better average height, dry weight, leaf area and lower SOD activity after 45 days of acclimatization, highlighting the influence of stress reduction and balance in plants. The substrate volume of 95 cm³ is the most suitable for acclimatization and plant production of sugarcane.

Keywords : *Saccharum*, biomass, tillering, leaf area, water content, hydrogen peroxide, superoxide dismutase.

1 - INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das culturas de destaque no Brasil, desempenha um papel importante em negociações de produtos agrícolas globais e, conseqüentemente, gera grande impacto na economia nacional, devido à produção do açúcar, silagem e biocombustível (DUVEILLER et al., 2013). Esse processo se deu ao longo de quase cinco séculos de exploração, desde a colonização europeia e sua exploração no Novo Mundo, o que fortaleceu o período colonial, originando as indústrias e destacando a nação como exportadora de açúcar (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011)

O setor sucroenergético do Brasil possui elevados níveis de produtividade, com faturamento anual em torno de 1,5 % do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (CONAB, 2013; IBGE, 2013). A safra brasileira para o período de 2013/2014 está estimada para uma produção de 652.015.900 toneladas (CONAB, 2013). Esse setor produtivo vem ganhando força em função da falta de reservas de petróleo, das preocupações com alternativas energéticas sustentáveis e as mudanças climáticas (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; OCTAVIANO, 2011).

Com as perspectivas para o crescimento dos mercados internos e externos da cana-de-açúcar, a principal estratégia para aumento de produtividade é o desenvolvimento de cultivares melhorados, através dos programas de melhoramento genético de plantas, que baseado na seleção e clonagem de genótipos superiores, buscam obter cultivares mais produtivos, com melhor desempenho agrônomico e tolerância a estresses bióticos e abióticos (SILVA et al., 2011).

O cultivo *in vitro* de plantas é a técnica que utiliza meio nutritivo para crescimento de explantes (diferentes células somáticas, tecidos ou órgãos vegetais) sob condições assépticas e ambientais controladas, com o objetivo de produzir um grande número de plantas, que são geneticamente idênticas à planta mãe, em um tempo relativamente curto em comparação com a propagação convencional (DOBRÁNSZKI; SILVA, 2010).

Por essa razão, a micropropagação tem sido a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecidos, sendo usada na rápida multiplicação de mudas saudáveis e uniformes (AREMU et al., 2012). Sendo assim, torna-se mais viável suprir a demanda do mercado agrônomico com redução do tempo para propagar novas cultivares (GERALD, 2011).

Os biorreatores de imersão temporária constituem um método de micropropagação em larga escala mais recente, desenvolvido na tentativa de aperfeiçoar o processo de produção de plantas *in vitro*, e com isso, potencializar os benefícios da micropropagação de modo a ultrapassar seus obstáculos (AKDEMIR et al., 2014). A aplicação desse novo sistema tecnológico é de extremo interesse para a produção de plantas em larga escala nas biofábricas (PENCHEL et al., 2007; ZIV et al., 2003).

A fase de aclimatização de plantas é considerada crítica, uma vez que as plantas sofrem mais um ciclo de estresse quando transferidas do laboratório para a estufa ou campo, implicando em estresses bioquímicos e fisiológicos que podem resultar em grandes perdas das mudas micropropagadas (DUTRA et al., 2009; OSÓRIO et al., 2013). Algumas pesquisas apresentam soluções tecnológicas que têm contribuído para a fase de aclimatização de mudas de cana-de-açúcar (LEE et al., 2007), porém são poucos os trabalhos que descrevem com minúcias os procedimentos de transplante e aclimatização de mudas de cana-de-açúcar (GUISELINI et al.; 2013), principalmente, nas condições de produção em larga escala (MEYER et al.; 2009).

Durante essa fase de adaptação, as plantas saem de um ambiente de alta umidade e temperatura amena para um ambiente pós vitro que detém baixa umidade e alta temperatura, podendo causar a perda rápida de água (DOBRÁNSZKI; SILVA, 2010). Outros aspectos desfavoráveis que influenciam no elevado percentual de perda na aclimatização são os elevados níveis de luminosidade, presença de microorganismos saprófitos e fitopatogênicos, além, do ataque de pragas (TAVEIRA, 2011).

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características gerais da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta herbácea, angiosperma, do tipo alógama e pertencente à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida (monocotiledonea), sub-classe Commelinidae, ordem Poales (Cyperales), família Poaceae, tribo Andropogonae e sub tribo Saccharinae (CASTRO; KLUGE, 2001). Esta espécie está inserida na quarta maior família em número de espécies, que são as poaceas, entretanto, as campeãs são as compostas (Asteraceae), as orquídeas (Orchidaceae) e as leguminosas (Leguminosae) (GIULIETTI et al., 2005).

O gênero *Saccharum* foi derivado da palavra grega “sakcharon” o que significa

açúcar e foi devidamente latinizado pelo autor, Linnaeus em 1753, em seu livro intitulado *Species Plantarum* (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Existem aproximadamente seis espécies desse gênero (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule*), sendo que a cana-de-açúcar cultivada agronomicamente é um híbrido multiespecífico, ganhando a nomenclatura: *Saccharum* spp. (TOPPA et al., 2011).

O surgimento dessa cultura possivelmente aconteceu de uma linhagem ancestral comum que divergiram entre os gêneros *Saccharum* L. e *Sorghum* há, aproximadamente, cinco a oito milhões de anos atrás (AL-JANABI et al., 1994; FIGUEIRA et al., 2008) nas localidades do sudeste Asiático, na região de Nova Guiné e Indonésia (SEGATO et al., 2006; JAMES, 2004).

A morfologia externa da cana-de-açúcar caracteriza-se por um caule aéreo e ereto, denominado colmo, de estrutura silicosa e com formato cilíndrico, apresentando nós e entrenós bem marcantes e com seus gomos cheios de um tecido (medula) com elevadas concentrações de sacarose (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; VIDAL, 2000).

O seu desenvolvimento se dá em forma de touceiras, na parte aérea, composta de colmos (nós alternados e entrenós), folhas (alternadas e ligadas à haste com uma folha por entrenó) e inflorescências (ramificada do tipo panícula com uma haste principal) e na parte subterrânea, formada de rizomas e raízes (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; CESNIK; MIOCQUE, 2004).

A fisiologia dessa espécie apresenta uma fotossíntese do tipo C4, que proporciona um acúmulo de biomassa vigoroso em climas tropicais, em contrapartida, em climas temperados seu crescimento é menos intenso (VU; ALLEN, 2009). Sendo assim, a cultura canavieira encontra melhores condições ambientais nas localidades que apresentem duas estações distintas, como no Brasil, que acaba tendo duas épocas de colheita anuais, de setembro a abril no Norte e Nordeste e de maio a dezembro no Centro-Sul, que corresponde às épocas secas nessas regiões, período quente e úmido com intensa radiação solar que proporciona a germinação, perfilhamento e desenvolvimento vegetativo (ALFONSI et al., 1987; CAPUTO et al., 2008).

Além disso, a vasta extensão territorial brasileira com os vários tipos de solos que estão sob influência de diferentes climas, faz da cana-de-açúcar um dos mais tradicionais produtos agrícolas (DIAS, 1997).

A produção de cana-de-açúcar tem a temperatura como fator de maior

influência, sendo a basal em torno de 20°C, a temperatura ótima entre 22 a 30°C, sendo que nessas condições a cultura apresenta seu máximo crescimento e sem crescimento acima de 38°C (MAGALHÃES, 1987).

Diante de tantas condições favoráveis, a cana-de-açúcar foi introduzida oficialmente no Brasil pelas expedições marítimas de Martim Afonso de Souza em meados de 1530 (CASTRO; KLUGE, 2001). A cultura ganhou destaque econômico mais significativo a partir de meados do século XVI, no instante em que foram instalados engenhos no nordeste brasileiro e iniciaram as atividades em Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe e Paraíba (MARIN; NASSIF, 2013). O Brasil tornou-se o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, graças à criação do programa Proálcool em novembro de 1975, uma estratégia de inserir o etanol na matriz energética brasileira, a fim de manter o crescimento econômico diante da crise do petróleo (MARIN; NASSIF, 2013). E, atualmente, a cana-de-açúcar é uma das maiores culturas agrícolas do país, que possui matéria-prima para produzir açúcar e álcool (CONAB, 2013).

A área brasileira cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroenergética na safra 2013/14 está estimada em 8.799.150 mil hectares, com produção de 652.015.900 toneladas (CONAB, 2013). A exportação brasileira de açúcar deverá ser de 25 milhões de toneladas e o consumo interno está previsto em torno de 11 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2012). Em 2011, as exportações do complexo sucroenergético ultrapassaram as exportações de carnes, assumindo o papel de segundo maior exportador, ficando atrás, apenas do complexo soja, respondendo por aproximadamente 44% das exportações mundiais de açúcar, estando já consolidado como uma grande peça no cenário internacional (CONAB, 2013).

Com a tendência de restrição do uso de hidrocarbonetos fósseis, determinada por pressões ambientalistas, econômicas e sociais geradas pelo agravamento do aquecimento global causado pelo efeito estufa, a área cultivada com a cana-de-açúcar deve crescer no país, aproximadamente, 83,0% nos próximos 10 anos (AGRIANUAL, 2012). No entanto, para que a produção de biocombustíveis seja sustentável ao longo dos anos, são necessários estudos que avaliem o balanço energético da cadeia produtiva como um todo (SALLA; CABELLO, 2010).

Dessa forma, o Brasil, além de ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, é também o primeiro produtor de açúcar e etanol e alcança, gradativamente, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (MAPA,

2012).

2.2 Cultura de tecidos de plantas

A cultura de tecidos de plantas é um conjunto de metodologias direcionadas ao favorecimento de uma combinação de divisão celular e expansão das células, que é altamente regulado por fatores ambientais (luz, temperatura, etc) e por fatores endógenos, tais como reguladores de crescimento (ONAY et al., 2011) em meios de cultura sob condições assépticas e ambiente controlado (CHANDRA et al., 2010). A técnica está fundamentada no estímulo da expressão da totipotência celular, ou melhor, na habilidade de uma única célula originar uma nova planta (RAVEN et al., 2010).

A utilização da cultura de tecidos em âmbito comercial já é realidade em diversos países do mundo, com destaque para os da Europa Ocidental, Estados Unidos, Ásia, Austrália e Israel, tendo a atividade comercial concentrada, em especial, na limpeza clonal e na multiplicação de plantas ornamentais, que ainda concentra o maior volume produzido (CARVALHO, 2012; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A técnica de micropropagação convencional é a modalidade mais aplicada dentro da cultura de tecidos (SEGEREN, 2011) e é geralmente realizada em pequenos frascos com meios nutritivos líquidos ou com agentes gelificantes, contendo nutrientes específicos e sacarose como uma fonte de carbono para os explantes, a um baixo fluxo de fótons fotossintéticos (XIAO et al., 2011). Esta técnica de propagação vegetativa é amplamente utilizada nas mais diversas espécies de plantas e vem apresentando aplicações práticas eficientes tornando possível a rápida produção em alta qualidade, com a manutenção da fidelidade genética do material propagado a partir de uma planta matriz selecionada (SEGEREN, 2011), independentemente da época do ano e com reuzido tempo (CHANDRA et al., 2010). É um método alternativo ao processo convencional de propagação vegetativa (CIDADE et al., 2006) que oferece grande potencialidade na obtenção de mudas livres de micro-organismos fitopatogênicos (ANDRADE et al., 2010).

Mesmo com tantas vantagens e contribuições valiosas na propagação, melhoramento e conservação de plantas, (CASTELBLANQUE et al., 2010; FAIZAL et al., 2011; PARIMALAN et al., 2011) a micropropagação de muitas espécies de plantas, no entanto, pode ocasionar alguns distúrbios fisiológicos, como anomalias morfológicas, epigenéticas e variação somaclonal, que são acidentalmente encontrados (BAIRUS et al., 2011; SMULDERS; DE KLERK 2011). Além disso, a escolha dos

reguladores de crescimento vegetais e suas concentrações são fundamentais para o sucesso e qualidade da cultura *in vitro* (WERBROUCK 2010; AMOO et al., 2011).

Com o propósito de amenizar esses problemas, vários procedimentos, incluindo a utilização de culturas sob agitação, os biorreatores com formação de bolhas, biorreatores com injeções contínuas e descontínuas de gases e os sistemas de imersão temporária (Figura 01) têm sido projetados e aplicados para diferentes espécies de plantas (AKDEMIR et al., 2014), como ilustra a figura 1.

Figura 01. Biorreator de Imersão Temporária (BIT) modelo em plástico PET de 5L utilizados no CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste) contendo uma das três variedades de cana-de-açúcar adotadas no experimento.



Fonte: André Dias (2013).

A imersão temporária proporciona maior rapidez e eficiência no processo fisiológico em relação aos demais métodos convencionalmente utilizados (ZIV et al., 2003), melhora a oxigenação, a nutrição dos explantes e as plantas através do meio de

cultura líquido temporário, que diminuem a ocorrência da hiper-hidricidade, melhorando a qualidade dos propágulos, e consequente, a sobrevivência durante a fase de aclimatização (MURCH et al., 2004).

Os biorreatores de imersão temporária consistem em dois frascos interconectados por mangueiras; num dos frascos encontra-se o meio de cultura e no outro os explantes; o ar é impulsionado por compressores e esterilizado por membrana de 0,22 µm proporcionando a passagem do meio líquido para as plantas; após um tempo de imersão pré-estabelecido, ocorre reversão do processo, ou seja, o meio sai do frasco que contém os explantes e retorna ao frasco que armazena o meio nutritivo; a frequência e o tempo de imersão são controlados por “timers” eletrônicos e válvulas solenóides (ESCALONA et al., 1999).

Esses biorreatores estão sendo aplicados com sucesso em diferentes espécies de plantas, como, por exemplo, *Saccharum* spp. (MORDOCCO et al., 2009), *Musa* AAB (ROELS et al., 2005), *Curcuma zedoaria*, *Zingiber zerumbet* (STANLY et al., 2010), *Siraitia grosvenorii* (YAN et al., 2010) e *Dioscorea fordii* e *D. alata* (YAN et al., 2011) para a micropropagação. Este sistema vem sendo favoravelmente usado para a cultura de embriões somáticos e para a produção de metabolitos secundários (PEREZ ALONSO et al., 2012; SCHUMANN et al., 2012).

2.3 Aclimatização

A aclimatização é a fase da micropropagação de plantas que consiste em transplantar as mudas da condição *in vitro* para *ex vitro*, uma situação em que as plantas estão mais sensíveis às condições ambientais: luminosidade, temperatura, adubação, irrigações, reguladores de crescimento e substratos (FREITAS, 2010). Define-se como um processo progressivo que acontece, normalmente, em casas de vegetação ou viveiros, e as plantas micropropagadas adaptam sua fisiologia mixotrófica para autotrófica, uma vez que não apresentam seu aparelho fotossintético totalmente funcional devido à baixa intensidade de luz *in vitro* e presença de carboidrato no meio de cultura (DOBRÁNSZKI; SILVA, 2010).

A fase de enraizamento, processo antecessor à aclimatização, exerce grande influência para o sucesso final da micropropagação, pois, plantas com sintomas de toxidez, deficiência nutricional e baixa qualidade do sistema radicular não favorecem o sucesso do transplante na etapa *ex vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As plantas transferidas do laboratório para o ambiente externo necessitam de

uma adaptação que é considerada crítica, implicando em estresses fisiológicos que podem prejudicar o estabelecimento de sucesso e a sobrevivência do material micropropagado (DEB; IMCHEN, 2010).

A passagem das plantas para as condições *ex vitro* expõe as plantas às altas temperaturas, alta intensidades de luz e baixa umidade, além de condições de estresse biótico, ou seja, microflora do solo, por isso a necessidade de aclimação (DEB; IMCHEN, 2010). Por isso, a criação de condições microclimáticas adequadas para as culturas nas estufas deve ser obtida a fim de controlar a radiação solar incidente no interior do ambiente protegido minimizando as mudanças abruptas no ambiente, que influenciam no crescimento e desenvolvimento das plantas (GUISELINI et al., 2010).

Essa transferência expõe as plantas às mudanças morfológicas nas folhas que podem influenciar negativamente nos processos de fotossíntese e transpiração (COSTA et al., 2009). Taveira (2011) afirma que nos dias iniciais da aclimação as plantas micropropagadas apresentam pouca funcionalidade das raízes, pouca eficiência na conexão entre os vasos de condução, reduzida formação da cutícula foliar e baixa funcionalidade estomática, que proporcionam um estresse hídrico significativo pelo novo ambiente que demanda aumento na taxa de transpiração.

Nas condições *in vitro*, os explantes foram seccionados do seu sítio original de um tecido vegetal e inseridos em meios de cultura sintéticos formulados com substâncias orgânicas e inorgânicas, além, dos reguladores de crescimento e suas concentrações não fisiológicas (SIVANESAN et al., 2011). Conseqüentemente, as plantas micropropagadas apresentam grandes estômatos com forma e estrutura alterada, espessura da folha reduzida, mesófilo indiferenciado entre parênquima paliádico e lacunoso (CHAMDRA et al., 2010).

Durante a aclimação, quando lentamente aclimatizadas, em condições de baixa umidade e alta intensidade de luz, as plantas são deficientes em ABA, mas sua concentração é aumentada, a sua conformação heterotrófica passa para autotrófica e a técnica de biotização em plantas micropropagadas pode resultar numa maior sobrevivência, crescimento, resistência a pragas e aumento da produtividade (CHAMDRA et al., 2010).

Outra maneira de assegurar maior sucesso na aclimação são os meios de cultura adequados, pois as plantas cultivadas nesses ambientes podem desenvolver estruturas que são mais adaptadas e mais eficientes para a planta na final da fase de enraizamento (SOARES et al., 2012). O uso dos biorreatores de imersão temporária

também são componentes importantes nesse processo, uma vez que reduzem ou controlam o excesso de água (UR) na atmosfera interna dos recipientes de cultivo, através do sistema de areação (VASCONCELOS et al., 2012; DANTAS et al., 2001). No entanto, apesar das vantagens trazidas pela cultura de tecidos vegetais, o uso comercial de micropropagação é limitado em muitas espécies devido às más taxas de sobrevivência plântula durante a aclimatização (POSPÍŠILOVÁ et al., 2009).

Portanto, um período para uma adaptação progressiva para o novo ambiente de crescimento faz-se imprescindível para o processo de aclimatização (DIAS et al., 2013) e por todas essas razões a aclimatização torna-se um dos principais gargalos da aplicação da micropropagação em larga escala (OSÓRIO et al., 2013).

2.4 O estresse

O estresse pode ser entendido como uma alteração nas condições vitais ótimas, proporcionando estímulos às mudanças e respostas em diversos níveis funcionais do organismo, que *a priori*, são reversíveis, mas podem tornar-se permanentes (LARCHER, 2000). As condições ambientais naturais expõem as plantas em situações de múltiplos estresses, como o calor, o frio, a seca, a salinidade, luminosidade, metais pesados, entre outros, que podem comprometer negativamente o crescimento e o metabolismo, limitando a produção das culturas (JAIN et al., 2010).

Os sistemas de micropropagação reúnem diversos fatores capazes de criar uma condição de estresse intrínseca e, somando-se à passagem das plantas para o ambiente *ex vitro*, ocasiona um estresse adicional e, conseqüentemente, riscos de perdas de mudas, ou redução do crescimento e fraco desenvolvimento (DIAS et al., 2013). Por isso, as plantas apresentam linhas de defesa, sendo, a primeira delas, a diminuição da condutância estomática, que com a redução da disponibilidade de água, por exemplo, evita a desidratação pela transpiração (RIVAS et al., 2013).

Em situações mais severas de estresse, a adequação às condições desfavoráveis pode resultar em eventos de natureza morfofisiológica e bioquímica (NOGUEIRA et al., 2005), que por sua vez, leva ao aumento do dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ROS) (UZILDAY et al., 2012). Essas estruturas bioquímicas (ROS) são capazes de rapidamente inativar enzimas, danificar organelas celulares vitais nas plantas, e destruir as membranas plasmáticas, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, que em última instância, acarretam a morte da célula (TAHMASEBI et al., 2012).

São geradas de uma pequena parcela dos elétrons que escapam da cadeia

respiratória, podendo ser produzidos por atividades de transporte de elétrons em cloroplastos e mitocôndrias, ocasionando uma redução parcial do oxigênio molecular (MEDEIROS et al., 2013), levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na forma do radical aniônico superóxido (O_2^-), do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila (OH.), além do oxigênio singleto (1O_2) resultante da excitação do oxigênio molecular (MITTLER, 2002).

Nesse âmbito, as plantas apresentam como defesa uma gama de enzimas antioxidantes e sistemas de defesa não enzimáticos capazes de neutralizar as células de dano oxidativo pelas ROS (CIA et al., 2012). Os sistemas enzimáticos incluem o conjunto de enzimas, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (GPOX) e glutathione redutase (GR) (MARTINS et al., 2011), além daqueles metabólitos não enzimáticos, como o ácido ascórbico, a glutathione, alcalóides, fenóis, tocoferóis e carotenóides (GRATÃO et al., 2005).

Dentre elas, a SOD é a primeira linha de combate, cuja função é a conversão de O_2 para H_2O_2 , porém, o H_2O_2 também é danoso para as células e é desintoxicado por outras enzimas para formar H_2O e O_2 (MONTEIRO et al., 2011). As consequências danosas podem ser medidas por quantificação de malonaldeído (MDA), o qual é um produto da peroxidação lipídica da membrana (CAKMAK et al., 1991).

Fatores ambientais são fontes de estresse em cana-de-açúcar e resultaram em perda de rendimento da cultura, a razão provável pode ser o distúrbio na síntese de proteínas e ácidos nucleicos que afetaram as propriedades de seu crescimento com altos níveis de H_2O_2 , elevados conteúdo de MDA e aumento da atividade de SOD, CAT e GPOX em folhas suas folhas, indicando dano oxidativo (JAIN et al., 2010).

Sob condições de estresse, as plantas podem manter a homeostase, pois as ROS em concentrações baixas atuam como moléculas de sinalização na indução de genes de defesa, porém, quando a quantidade de ROS é aumentada, levando à quebra da homeostase celular e em último caso, a morte celular (MEDEIROS et al., 2013; RIVAS et al., 2013), ou seja, esse sistema de defesa bioquímico é essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta, protagonista de uma importante função na integração vários sinais de estresse.

3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKDEMIR, H.; SÜZERER, V.; ONAY, A.; TILKAT, E.; ERSALI, Y.; ÇİFTÇİ, Y. O. Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion

system. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, p.1-12, 2014.

ALFONSI, R. R.; PEDRO JUNIOR, M. J.; BRUNINI, O.; BARBIERI, U. In: PARANHOS, S. B. (Coord.). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**, Campinas: Fundação Cargil, v.1, p.42-55, 1987.

AL-JANABI, S. M.; HONEYCUTT, R. J.; PETERSON, C.; SOBRAL, B. W. S. Phylogenetic analysis of organellar DNA sequence in Andropogoneae: *Saccharum*. **Theoretical and applied genetics**, p.933-934, 1994.

AMOO, S.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. The role of *meta*-topolins in alleviating micropropagation problems. **Plant Growth Regul**, v.63, p.197–206, 2011.

ANDRADE, S. R. M., RIBEIRO, L. M., VIEIRA, L. M., PEREIRA, W. V. S., FOGAÇA, C. M., ROSA, S. D., JUNQUEIRA, N. T. V. **Limpeza Clonal de Maracujá por Microenxertia ex vitro Visando à Eliminação de Vírus-do-endurecimento-dos-frutos**, Planaltina, Embrapa Cerrados, p.1-29, 2010.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA (AGRIANUAL). **Mercado e perspectivas-cana**. São Paulo: Instituto FNP, p.497, 2012.

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; DOLEŽAL, K.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.108, p.1–16, 2012.

BAIRUS, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regul**. v. 3, p.147–173, 2011.

CAKMAK, I.; HORST, J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*), **Physiol. Plant**, v. 83, n. 3, p. 463 – 468, 1991.

CAPUTO, M. M.; BEAUCLAIR, E. G. F.; SILVA, M. A.; PIEDADE, S.M.S. Resposta de genótipos de cana-de-açúcar à aplicação de indutores de maturação. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 15-23, 2008.

CARVALHO, A. C. P. P. Panorama de mudas micropropagadas no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília-DF, v. 30, n. 2, 2012.

CASTELBLANQUE, L.; GARCÍA-SOGO, B.; PINEDA, B.; MORENO, V. Efficient plant regeneration from protoplasts of *Kalanchoe blossfeldiana* organogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.100, p.107–112, 2010.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Ed.). **Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar; seringueira; coqueiro; dendezeiro e oliveira**. Cosmópolis: Editora Stoller do Brasil, 2001, p.138.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da Cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa, 2004, p.23-26.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 9, p. 1199 - 1205, 2010.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; DE OLIVEIRA FIGUEIRA, A. V.; DE SOUSA FILGUEIRAS, T. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Trop. Plant Biol**, v. 4, p. 62–89. 2011.

CIA, M. C.; GUIMARÃES, A. C. R.; MEDICI, L. O.; CHABREGAS, S. M.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and-sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, n. 3, p. 313-324, 2012.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Cana-de-açúcar**. Disponível em: Acesso em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_05_09_11_59_boletim_cana_portugues_-_agosto_2012_2o_lev.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2013.

COSTA, F. H. S., PEREIRA, J. E. S.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Revista Ciência Rural**, n. 39, p. 742-748, 2009.

DANTAS, A. K; Majada, J. P.; Fernández, B.; Cañal, M. J. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. **Plant Growth Regulation**, v.33, p.237-243, 2001.

DEB, C. R.; IMCHEN, T. An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants. **Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 79-83, 2010.

DIAS, F.L.F. **Relação entre a produtividade, clima, solos e variedades de cana-de-açúcar, na Região Noroeste do Estado de São Paulo**. 1997. Piracicaba, 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

DIAS, M. C.; PINTO, G.; CORREIA, C.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; SILVA, S.; SANTOS, C. Photosynthetic parameters of *Ulmus minor* plantlets affected by irradiance during acclimatization. **Biol. Plant.**, v. 57, p. 33-40, 2013.

DOBRÁNSZKI J.; SILVA J.A.T. Micropropagation of apple - A review. **Biotechnol Adv.**,v.28, n.4, p.462-88, 2010.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.58, p.49-59, 2009.

DUVEILLER, G.; LOPEZ-LOZANOM R.; BARUTH, N. Enhanced processing of low spatial resolution fAPAR time series for sugarcane yield forecasting and monitoring. **Remote Sens.**, v. 5, p. 1091-1116, 2013.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; DANQUITA, M.; GONZALES, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G. Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, v.18, p.743-748, 1999.

FAIZAL, A.; LAMBERT, E., FOUBERT, K., APERS, S., GEELEN, D. *In vitro* propagation of four saponin producing Maesa species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 2, p. 215-223, 2011.

FIGUEIRA, T. R. S.; SERRANO, G. C. M.; ARRUDA, P. Evolution of the genes encoding seed storage proteins in sugarcane and maize. **Trop Plant Biol**, v. 1, p. 108–119, 2008.

FREITAS, S. J. **Brassinosteróides e adubação no desenvolvimento, crescimento e nutrição de mudas de abacaxi**. 100 f. Tese (Doutorado Produção vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2010.

GERALD, L. T. S.; LEE, L. L. **Biofabrica e sua influência na produtividade de cana-de-açúcar**. In: Lee Tseng Sheng Gerald. (Org.). Biofabrica de plantas. 1ed. São Paulo: Antiqua, 2011, p. 118-133.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P. de; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, CASSIO, V. D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52-61, 2005.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481 - 494, 2005.

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

GUISELINI, C., PANDORFI, H., BARROS, A. C., DA SILVA, L. F., DA SILVA NETO, S. P. Aclimatização de mudas de cana-de-açúcar em ambiente protegido sob dois tipos de malhas de sombreamento. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 17, n. 8, p. 877-882, 2013.

GUISELINI, C.; SENTELHAS, P. C.; PANDORFI, H.; HOLCMAN, E. Manejo da cobertura de ambientes protegidos: Radiação solar e seus efeitos na produção da gérbera. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v.14, p.645-652, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIAS E ESTATÍSTICAS (IBGE). **PIB 2013**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acesso em 13 ago. 2013.

JAIN, R., SRIVASTAVA, S., SOLOMON, S., SHRIVASTAVA, A. K., CHANDRA, A. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 5, p. 979-986, 2010.

JAMES, G. **Sugarcane**. 2 ed. Oxford: Blackwell, 2004, p. 216.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000, p. 531.

LEE, T. S. G.; BRESSAN, E. A.; SILVA, A. D. C. DA; LEE, L. L. Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.13, p.2032-2040, 2007.

MAGALHÃES, A. C. N. **Ecofisiologia da cana-de-açúcar: aspectos do metabolismo do carbono da planta**. In: Castro, P. R. C.; Ferreira, S. O.; Yamada, T. (Coord.) *Ecofisiologia da Produção*, Piracicaba, Associação Brasileira para pesquisa do Potássio e do Fosfato, 1987, p.113-118.

MARIN, F.; NASSIF, D. F. Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 17, n. 2, p. 232-239, 2013.

MARTINS, P. F.; CARVALHO, G.; GRATAO, P. L.; DOURADO, M. N.; PILEGGI, M.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, R. A. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1186–1195, 2011.

MEDEIROS, C. D., NETO, J. R. F., OLIVEIRA, M. T., RIVAS, R., PANDOLFI, V., KIDO, É. A., SANTOS, M. G. Photosynthesis, antioxidant activities and transcriptional responses in two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars under salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 2, p. 447-459, 2014.

MEYER, L.; SEREK, M.; WINKELMANN, T. Protoplast isolation and plant regeneration of different genotypes of *Petunia* and *Calibrachoa*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.99, p.27-34, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 13 out. 2012.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p. 405-410, 2002.

MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; GRATÃO, P. L.; CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, L. O.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 306–320, 2011.

MORDOCCO, A. M.; BRUMBLEY, J. A.; LAKSHMANAN, P. Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 45, n. 4, p. 450-457, 2009.

MURCH, S. J.; LIU, C.; ROMERO, R. M. e SAXENA, P. K. *In vitro* Culture and Temporary Immersion Bioreactor Production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 78, p. 63–68, 2004.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.75-87, 2005.

OCTAVIANO, C. Mudança de petróleo para biomassa impulsiona a química verde. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**, Campinas, n. 130, 2011.

ONAY, A.; YILDIRIM, H.; TOKATLI, Y. O.; AKDEMIR, H.; SUZERER, V. Plant tissue culture techniques - Tools in plant micropropagation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 130, 2011.

OSÓRIO, M. L.; GONÇALVES, S.; COELHO, N.; ROMANO, A.; OSÓRIO, J. How to monitor the acclimatization of micropropagated plants - From *in vitro* to the field? **Acta Horticulturae**, v.988, p.65-70, 2013.

PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 105, p. 285–290, 2011.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: UFV, c. 4, p.75-92, 2007.

PEREZ-ALONSO, N.; CAPOTE, A.; GERTH, A.; JIMENEZ, E. Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 110, p. 153–162, 2012.

POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; HAISEL, D.; BAŤKOVÁ, P. Effect of abscisic acid on photosynthetic parameters during *ex vitro* transfer of micropropagated tobacco plantlets. **Biol. Plant.**, v. 53, p. 11-20, 2009.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. In: **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2010, p.634.

RIVAS, R., OLIVEIRA, M., SANTOS, M. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.63, p. 200-208, 2013.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 82, p. 57–66, 2005.

SALLA, D. A.; CABELLO, C. Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca, cana-de-açúcar e milho. **Revista Energia na Agricultura**, v.25, n.2, p.32-53, 2010.

SCHUMANN, A.; BERKOV, S.; CLAUS, D.; GERTH, A.; BASTIDA, J.; CODINA, C. Production of galanthamine by *Leucojum aestivum* shoots grown in different bioreactor systems. **Appl Biochem Biotech**, v. 167, n. 7, p. 1907-1920, 2012.

SEGATO, S. V.; PINTO, A. D. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. D. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livrocere, 2006, p. 19-36.

SEGEREN, M. I. Micropropagação *in vitro* de flores e plantas ornamentais. In: Lee TsengSheng Gerald. (Org.). **Biofabrica de plantas**. 1ed. São Paulo: Antiqua, 2011, p. 118-133.

SILVA, E. T., DE SOUZA, E. P., SANTOS, R. D. S., BARBOSA, M. S. A engenharia genética aplicada no melhoramento da cana-de-açúcar: uma nova alternativa para a produção de biodiesel de segunda geração. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 3-23, 2011.

SIVANESAN, I.; LIM, M. Y.; JEONG, B. R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and petiole explants of *Campanula punctata* Lam. var. rubriflora Makino. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 107, n. 2, p. 365-369, 2011.

SMULDERS, M.; DE KLERK, G. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regul**, v. 63, p. 137-146, 2011.

SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G. D.; CASTRO, E. M. D.; PEREIRA, F. J.; BRAGA, F. T. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n.4, p. 413-421, 2012.

STANLY, C.; BHATT, A.; KENG, C. L. A comparative study of *Curcuma zedoaria* and *Zingiber zerumbet* plantlet production using different micropropagation systems. **Afr J Biotech**, v. 9, n. 28, p. 4326-4333, 2010.

TAHMASEBI, A.; ARAM, F.; EBRAHIMI, M.; MOHAMMADI-DEHCESHMEH, M.; EBRAHIMIE, E. Genome-wide analysis of cytosolic and chloroplastic isoforms of glutathione reductase in plant cells. **Plant Omics**, v. 5, n. 2, p. 94-102, 2012.

TAVEIRA, J. A. M. Novas tecnologias na aclimatização, formação e manejo de mudas. In: Lee TsengSheng Gerald. (Org.). **Biofabrica de plantas**. 1ed. São Paulo: Antiqua, 2011, p. 245 - 267.

TOPPA, E. V. B., JADOSKI, C. J., JULIANETTI, A., HULSHOF, T., ONO, E. O. Aspectos da fisiologia de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum Officinarum* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 3, n. 3, 2011.

UZILDAY, I. TURKAN, A. H. SEKMEN, R. OZGUR, H. C. KARAKAYA, H. C. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress, **Plant Sci.**, v. 182, p. 59-70, 2012.

VASCONCELOS, A. G. V.; TOMAZ, L. F.; WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 837-844, 2012.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica: organografia**. 4 ed. Viçosa: UFV, 2000, p.98.

VU, J. C. V; ALLEN Jr., L.H. Stem juice production of the C4 sugarcane (*Saccharum officinarum*) is enhanced by growth at double-ambient CO₂ and high temperature. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.1141-1151, 2009.

WERBROUCK, S. P. O. Merits and drawbacks of new aromatic cytokinins in plant tissue culture. **Acta Horti**, v. 865, p. 103–108, 2010.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.105, n. 2, p. 149-158.2011.

YAN, H. B.; LIANG, C. X.; LI, Y. R. Improved growth and quality of *Siraitia grosvenorii* plantlets using a temporary immersion system. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 103, p. 131–135, 2010.

YAN, H. B.; YANG, L.; LI, Y. Improved growth and quality of *Dioscorea fordii* Prain et Burk and *Dioscorea alata* plantlets using a temporary immersion system. **Afr J Bio**, v. 10, n. 83, p. 19444-19448, 2011.

ZIV, M.; CHEN, J.VISHNEVETSKY, J. Propagation of Plants in Bioreactors: Prospects and Limitations. In: ECONOMOU, A. S.; READ, P. E. (Eds) Proc1st ISON Accl.&Etab.Microprop.Plants, **Acta Horticulturae**.v.616,p.85-93, 2003.

4 - MANUSCRITO

Aclimatização de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em distintos volumes de substrato: biometria e sistema antioxidativo



Aclimatização de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) em distintos volumes de substrato: biometria e sistema antioxidativo

A. L. F. Dias¹, G. M. Melo², M. R. Barbosa², M. B. Morais², T. R. Camara²

1 Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife, Pernambuco, Brasil

2 Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil

Correspondência: A. L. F. Dias, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Av. Prof. Luiz Freire, nº 01, Cidade Universitária, Cep: 50.740-540, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: andre.dias@cetene.gov.br.

www.cetene.gov.br

RESUMO

A micropropagação de plantas proporciona a produção de grandes números de plantas e a fase da aclimatização é de suma importância para a adaptação dessas mudas ao ambiente externo. Objetivou-se avaliar mudas de cana-de-açúcar das variedades RB931011, RB92579 e RB98710 em diferentes volumes de substrato. As mudas foram micropropagadas em sistema de imersão temporária e aclimatizadas por 45 dias em estufa em dois volumes de substrato 55 cm³ e 95 cm³. Avaliou-se: a sobrevivência; altura; número de plantas perfilhadas; massa seca da parte aérea e raiz, área foliar, coeficiente hídrico relativo, densidade estomática, as enzimas do sistema antioxidativo (SOD, CAT e APX), teor do aldeído malônico e peróxido de hidrogênio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 2 (variedades x volume) com 20 repetições. Aplicou-se ANOVA e o teste de Scott-Knott a 5% para comparação das médias. As variedades RB92579 e RB98710 apresentaram mais robustez atingindo as maiores médias biométricas e maior taxa de sobrevivência na aclimatização. O maior volume de substrato proporcionou maior média de altura, peso da matéria seca, área foliar e menor atividade da SOD aos 45 dias de aclimação, destacando-se na influência da redução e equilíbrio do estresse nas mudas. O volume de substrato de 95 cm³ é o mais indicado para a aclimatização e produção de mudas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum*, biomassa, perfilhamento, área foliar, conteúdo hídrico, peróxido de hidrogênio, superóxido dismutase.

33 INTRODUÇÃO

34 A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. L.) é uma das culturas de maior destaque no
35 Brasil por seus variados produtos como, açúcar, etanol e bioenergia, entre outros (Rocha
36 et al., 2013). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com uma
37 produção anual estimada de 670 milhões de toneladas, vindo seguido da Índia e China
38 (FAO 2013).

39 Para atender a alta demanda do mercado sucroenergético é necessária a
40 utilização de tecnologias que acelerem o processo de multiplicação de novas variedades
41 desenvolvidas pelos programas de melhoramento, disponibilizando-as mais rapidamente
42 aos agricultores (Gerald & Lee 2011).

43 A micropropagação é uma técnica que permite produzir um grande número de
44 plantas geneticamente idênticas a uma matriz, em um tempo relativamente curto em
45 comparação com a propagação convencional (Dobránszki & Silva 2010).

46 A aclimatização é o estágio final da propagação *in vitro*, e consiste na
47 rustificação das plantas para sua adaptação às condições *ex vitro*, impondo-lhes uma
48 condição ambiental que demanda aumento na taxa de transpiração e fotossíntese,
49 implicando em estresses que podem resultar em grandes perdas do material
50 micropropagado (Taveira, 2011). No ambiente *ex vitro* as plantas são expostas a uma
51 maior intensidade luminosa que pode causar fotoinibição, além de ficarem sujeitas a
52 baixa umidade atmosférica (em relação ao ambiente *in vitro*) que pode acarretar estresse
53 hídrico (Dias *et al.* 2011; Osório *et al.* 2013).

54 Além da parte aérea, o sistema radicular das plantas aclimatizadas é geralmente
55 submetido a reduzido volume de substrato em pequenos recipientes que limitam o
56 crescimento radicular e podem gerar uma condição desfavorável que leva ao estresse
57 (Shi *et al.* 2008).

58 Essas condições estressantes induzem um aumento na geração de espécies
59 reativas de oxigênio que demanda uma estratégia de manutenção da homeostase redox
60 celular. Para tanto, as plantas desenvolveram uma linha de defesa que previne o estresse
61 oxidativo. Este sistema defensivo é constituído pelas enzimas antioxidantes e por
62 metabólitos não enzimáticos que mantêm os níveis de espécies reativas de oxigênio
63 (ERO) e evitam danos a macromoléculas e estruturas supramoleculares (Medeiros *et al.*
64 2012; Rivas *et al.* 2013).

65 A investigação científica voltada especificamente para a aclimatização de
66 plantas micropropagadas ainda é escassa. A aplicabilidade a nível industrial da
67 micropropagação de plantas requer um conhecimento abrangente e aprofundado dos
68 aspectos fisiológicos e bioquímicos das plantas frente ao processo de aclimatização *ex*
69 *vitro* de maneira a direcionar arranjos metodológicos funcionais e seguros que
70 minimizem as perdas de mudas na aclimatização. Nesse trabalho, objetivou-se avaliar o
71 desenvolvimento fisiológico e bioquímico de mudas de cana-de-açúcar das variedades
72 RB931011, RB92579 e RB98710, em diferentes volumes de substrato durante a
73 aclimatização.

74 **MATERIAL E MÉTODOS**

75 **Material vegetal e condições experimentais**

76 Mudas de cana-de-açúcar das variedades RB931011, RB92579 e RB98710
77 foram micropropagadas em meio MS (Murashige & Skoog 1962), a partir da introdução
78 de ápices caulinares. As variedades RB931011 e RB92579, são consideradas tolerantes
79 ao estresse hídrico e a variedade RB98710, é apontada como sensível. Esses ápices
80 permaneceram em tubos de ensaio, em sala de crescimento sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$
81 em câmara escura por 10 dias, quando então, foram submetidos ao fotoperíodo de 16
82 horas e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por mais 20 dias. Em seguida, na fase

83 de multiplicação, foram transferidos para cultivo em biorreatores de imersão temporária
84 (BIT), cujas garrafas eram compostas por plástico PET altamente transparente com
85 dimensões: 29,5 cm de altura, 18 cm de diâmetro e capacidade para 5L.

86 Nessa fase foram realizados seis subcultivos, um a cada 20 dias. Após 20 dias
87 em meio de enraizamento, última fase *in vitro*, o material vegetal foi retirado dos BIT e,
88 em seguida, levado à estufa para aclimatização.

89 Para a aclimatização, as plantas foram individualizadas, lavadas em água
90 corrente para a remoção de resíduos de meio nutritivo, restos de cultura das raízes e, por
91 fim, plantadas em seus respectivos tratamentos.

92 A micropropagação foi realizada no Laboratório de Pesquisas Aplicadas à
93 Biofábrica (LAPAB) e a aclimatização em estufa de aclimatização, ambos pertencentes
94 às instalações da Biofábrica Governador Miguel Arraes do CETENE (Centro de
95 Tecnologias Estratégicas do Nordeste), no município de Recife com latitude de 8° 04'
96 03" S, longitude de 34° 55' 00" W e altitude de 7 m, cujo clima é quente e úmido do tipo
97 As', segundo a classificação climática de Köppen, com temperatura média de 25,2°C.

98 As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos
99 Vegetais (LCTV) do Departamento de Química da UFRPE. A adaptação ao ambiente *ex*
100 *vitro* aconteceu em local protegido (estufa de aclimatização), com dimensões de 3,5 m
101 de pé-direito, largura de 6,4 m e 12 m de comprimento, totalizando uma área de 76,8 m²
102 (comprimento x largura). O piso dos ambientes era constituído de barro batido coberto
103 com uma camada de brita de aproximadamente 10 cm.

104 O material estrutural da estufa era de ferro galvanizado e para o fechamento
105 lateral dos mesmos foi utilizada malha de proteção antiafídica. Metade da estufa esteve
106 coberta com plástico leitoso e a outra metade com associação à malha de sombreamento

107 preta (70% de retenção de luz), instalada na superfície interna, a 1,8 metros de altura em
108 relação ao topo das bancadas.

109 A fertirrigação das mudas em aclimatização foi composta com Calcinit[®] e
110 Kristalon[®], aplicados diariamente e, CodaFe-L[®], uma vez na semana.

111 As três variedades foram plantadas no substrato Carolina Soil[®] nos volumes de
112 55 cm³ e 95 cm³ em tubetes plásticos de 6 e 8 estrias, respectivamente, em bandejas
113 para 108 tubetes. Dessa forma, constituíram-se os seguintes tratamentos: T1
114 (RB931011 – 55 cm³), T2 (RB931011 – 95 cm³), T3 (RB92579 – 55 cm³), T4
115 (RB92579 – 95 cm³), T5 (RB98710 – 55 cm³) e T6 (RB98710 – 95 cm³).

116 As plantas utilizadas na aclimatização foram padronizadas para um tamanho
117 médio na faixa de 10 a 12 cm de altura. Foram mantidas 20 repetições por tratamento.
118 As plantas permaneceram 15 dias em estufa com malha de 70% de sombreamento (MS),
119 quando então foi feita a sua remoção da malha e as plantas ficaram expostas, por mais
120 15 dias, apenas à cobertura plástica (CP). Por fim, as plantas foram transferidas para sol
121 pleno (SP), onde permaneceram por 15 dias. Esses três diferentes ambientes que
122 compuseram o panorama completo da aclimatização apresentaram temperatura média
123 de 28°C, média de 72% de umidade relativa do ar e uma variação na intensidade
124 luminosa, conforme tabela 1.

125 O regime de rega nas estufas foi de microaspersão por dois minutos, acionado
126 quatro vezes ao dia, além de duas fertirrigações diárias.

127 Durante os experimentos foram mensuradas a temperatura e a umidade relativa
128 do ar (UR) nos três ambientes com auxílio de um *datalogger* Perceptec[®], modelo DHT-
129 2220 e a intensidade luminosa com um luxímetro TES[®] de modelo 1332A.

130 **Análises biométricas**

131 Os registros biométricos foram realizados a cada 15 dias em 20 plantas por
132 tratamento. Foram coletados dados das variáveis número de folhas (NF), altura da
133 planta (AP) e percentagem de plantas perfilhadas (%P). A massa seca da parte aérea
134 (MSa) e radicular (MSr) foram medidas apenas no final do experimento, quando
135 também calculou-se o percentual de sobrevivência (%S). A área foliar (AF) foi medida
136 através do Programa Image Pro Plus Versão 4.5 em sete plantas por tratamento.

137 **Coefficiente hídrico relativo**

138 O conteúdo hídrico relativo (CHR) foliar foi determinado em 20 amostras por
139 tratamento, também ao final do experimento. Foram coletados segmentos foliares sem a
140 nervura central. Os segmentos coletados (1 cm² de área) foram acondicionados em
141 placas de Petri com tampa para pesagem da massa fresca. Em seguida adicionou-se água
142 destilada nas placas e o peso da massa túrgida foi obtido após 24 h. Para o peso da
143 massa seca, os discos foram submetidos a estufa a 60 °C por 72 h. As medidas foram
144 realizadas em balança analítica de precisão Marca Marte, modelo AY220. O CHR foi
145 obtido a partir da fórmula: $CHR = (MF - MS) / (MT - MS) \times 100\%$, em que MF, MS e
146 MT representam a massa fresca, massa seca e a massa túrgida, respectivamente (Barrs
147 & Weatherley 1962).

148 **Densidade estomática**

149 Para a determinação da densidade estomática foram realizados cortes
150 paradérmicos da região mediana do terço médio da lâmina foliar. As epidermes foram
151 dissociadas em solução de hipoclorito de sódio (10%) por sete dias, neutralizadas em
152 solução de ácido acético 1% v/v, coradas com Safranina (1%) e Azul de Metileno (1%)
153 (Bukatsch 1972). A montagem das lâminas fez-se com lamínulas e glicerina (50%)
154 (Strassburger 1924). A medida da densidade estomática foi realizada utilizando os
155 aplicativos do software ImageJ versão 1.47t.

156 **Análises bioquímicas e determinação da atividade enzimática**

157 Os registros bioquímicos foram coletados em momentos específicos em cinco
158 plantas por tratamento. Amostras de tecido foliar fresco ($0,2g \pm 0,1$) foram coletadas de
159 plantas enraizadas *in vitro* e de plantas no final do período experimental, aos 45 dias de
160 aclimatização. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em
161 freezer (-20°C) até o momento de sua homogeneização em tampão extrator contendo
162 fosfato de potássio pH 7,0 para centrifugação a 14.000 g em 4°C . O sobrenadante foi
163 utilizado como extrato proteico para as análises de atividades enzimáticas, determinadas
164 por espectrofotometria.

165 A determinação do teor de proteína solúvel (Bradford 1976) foi realizada com
166 espectrofotômetro de duplo feixe ajustado ao comprimento de onda de 595 nm.

167 Foi determinada a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC
168 1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e catalase (CAT, 1.11.1.6). A
169 atividade da SOD foi determinada pela habilidade de inibir a redução fotoquímica do
170 azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis & Ries, 1977). A atividade da catalase
171 (CAT) foi determinada pela decomposição de H_2O_2 e ascorbato, por espectrofotômetro
172 a 240 nm (Berris & Sizer 1952). A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi
173 detectada pela variação da absorbância do ascorbato consumido na reação a 290 nm
174 (Nakano & Asada 1981).

175 Foi avaliada a peroxidação lipídica por meio da medida do teor do aldeído
176 malônico (MDA) (Cakmak & Horst 1991) e o teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
177 (Alexieva *et al.* 2001).

178 **Análises estatísticas**

179 O desenho experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 3×2
180 (variedades e volumes de substrato) com 20 repetições, sendo cada repetição

181 representada por 1 planta por tubete. Aplicou-se a análise de variância (ANOVA) e as
182 médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de
183 probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.

184 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

185 As mudas da variedade RB92579 apresentaram as maiores médias de altura ao
186 longo de todo o período experimental, sendo equiparada pela RB98710 a partir do 30º
187 dia, enquanto que a RB931011 manteve sempre as menores médias (Tabela 2). Aos 30
188 dias de aclimatização, a RB931011, quando cultivada sob cobertura plástica por 15 dias,
189 respondeu positivamente ao aumento do volume de substrato. Resposta semelhante foi
190 exibida pela variedade RB92579, aos 45 dias de aclimatização, sob cultivo em sol pleno
191 por 15 dias (Tabela 2). A variável altura apresentou as maiores médias em plantas de
192 *Heliconia lingulata* aclimatizadas no volume de substratos de 300 cm³ e as menores
193 médias foram proporcionadas pelo menor volume testado de 100 cm³ (Rocha *et al.*
194 2009). Esses resultados podem ser consequência da maior disponibilidade hídrica e
195 nutricional que favorece o maior desenvolvimento da planta (Santos *et al.* 2013).

196 No que se refere ao número de folhas, o aumento no volume de substrato
197 favoreceu apenas a variedade RB98710 nos primeiros 15 dias da fase de aclimatização,
198 quando ainda estava submetida à cobertura plástica. Entre as variedades, a RB931011
199 manteve o menor número de folhas (Tabela 2). Porém, no fim do experimento, o
200 quantitativo de folhas não foi influenciado pelos volumes testados. Isso pode ter sido
201 consequência do estágio semelhante das mudas e a diferença da área ocupada pelas
202 raízes entre os volumes de substrato testados não serem tão diferentes (Rocha *et al.*
203 2009). Em contra partida, na aclimatização de plantas micropropagadas de helicônia, os
204 tratamentos com maiores volumes de recipientes influenciaram no número de folhas, a
205 partir de 180 cm³ (Rocha *et al.* 2009).

206 A taxa de sobrevivência foi superior nas variedades RB92579 (91%) e RB98710
207 (92%), bem como os maiores valores biométricos de altura e número de folhas,
208 enquanto que a RB931011 atingiu uma menor marca de 80,5%, sendo
209 significativamente inferior às demais. Na aclimatização de plantas micropropagadas da
210 variedade RB931003 de cana-de-açúcar, houve 100% de sobrevivência das plantas em
211 aclimatizadas em 121,2 cm³ de volume de substrato (Menezes *et al.* 2012), o que sugere
212 que um volume de substrato superior a 95 cm³ pode melhorar o índice de sobrevivência
213 na aclimatização de genótipos de cana-de-açúcar.

214 Não houve efeito do volume de substrato (55 cm³ e 95 cm³) com relação ao
215 percentual de plantas perfilhadas, que foi de 68% e 60%, respectivamente. Por outro
216 lado, as variedades comportaram-se de forma variável em função do volume de
217 substrato. A variedade RB92579 destacou-se entre as demais, apresentando a totalidade
218 das plantas perfilhadas (100%), enquanto que apenas 17,5% das plantas da variedade
219 RB931011 perfilharam. A variedade RB98710 apresentou um valor intermediário
220 (75%).

221 O volume de substrato de 95 cm³ proporcionou maior produção de massa seca
222 da parte aérea em todas as variedades testadas (Tabela 3). A variedade RB98710
223 destacou-se positivamente obtendo as maiores médias em ambos os volumes testados
224 enquanto que a variedade RB931011 apresentou as menores médias. Essa variedade
225 também apresentou a menor biomassa seca radicular, independente do volume de
226 substrato. No tratamento com maior volume de substrato (95 cm³), observaram-se as
227 maiores médias de massa seca radicular nas variedades RB92579 e RB98710. As raízes
228 são responsáveis pela sustentação das plantas e constituem a principal via de absorção
229 de água e dos nutrientes. Um maior volume de substrato favorece o desenvolvimento
230 radicular, que se reflete na capacidade de produção de biomassa a partir da parte aérea.

231 Mudanças aclimatizadas de abacaxizeiro ornamental apresentaram melhor desenvolvimento
232 com relação ao número de folhas, massa seca da parte aérea e radicular quando
233 cultivadas em tubetes, em comparação com o cultivo em bandejas com células de menor
234 volume (Carvalho *et al.* 2012).

235 O maior volume de substrato favoreceu o desenvolvimento da área foliar nas
236 variedades RB92579 e RB98710, que não diferiram estatisticamente entre si no
237 tratamento com 55 cm³ de substrato. Entretanto, no volume de 95 cm³, a RB92579
238 apresentou a maior média entre as três variedades. Já a RB931011 apresentou médias
239 significativamente inferiores às demais. O estudo de diferentes recipientes na produção
240 de mudas de tomateiro e pepineiro, concluiu-se que quanto maior o volume do
241 recipiente empregado, maior a produção de biomassa total e da parte aérea como
242 também maior área foliar das plantas (Barros 1997).

243 A necessidade de aclimatização de um grande número de plantas produzidas em
244 biofábricas leva ao uso de bandejas com células de reduzido volume, o que pode
245 restringir o desenvolvimento radicular e aumentar a percentagem de perdas das mudas,
246 ou contribuir para a formação de mudas menos robustas. Os recipientes para
247 aclimatização devem ser preenchidos por substratos que proporcionem maior
248 porosidade e aeração, além de disponibilidade de água e nutrientes (Wien 1997). O
249 melhor desenvolvimento das plantas nos tubetes de 95 cm³ deveu-se às características
250 intrínsecas desses recipientes, com maior profundidade, além da capacidade
251 volumétrica, dificultando a perda de água por evaporação, conseqüentemente, maior
252 disponibilidade de oxigênio, por conta do maior volume de macroporos preenchidos
253 com ar, o que é mais adequado para o desenvolvimento do sistema radicular das mudas
254 (Carvalho 2012).

255 O uso de recipientes mais rasos pode ocasionar problemas de deformações
256 radiculares, que podem persistir em fases posteriores, destacando-se a necessidade de
257 priorizar metodologias de produção de mudas que viabilizem o melhor desenvolvimento
258 e arquitetura do sistema radicular, como também, o provimento nutricional às mudas
259 (Brachtvogel & Malavasi 2010; Medeiros *et al.* 2010)

260 O conteúdo hídrico relativo (CHR) foliar não variou em função dos fatores
261 testados. As plantas das três variedades apresentaram valores de CHR acima de 90%,
262 aos 45 dias de aclimatização, independente do volume de substrato. Plantas recém-
263 aclimatizadas podem apresentar alto conteúdo hídrico relativo, uma vez que ainda
264 menor condutância estomática e menor transpiração (Díaz-Pérez *et al.* 1995). No
265 sistema de aclimatização utilizado neste trabalho, o tipo de substrato e o regime de rega
266 parecem ter sido adequados de forma a garantir disponibilidade hídrica, independente
267 do pouco volume de substrato. Em situações de limitação hídrica, muitas características
268 fisiológicas podem ser afetadas nos tecidos vegetais. Em resposta à menor
269 disponibilidade de água pode haver a redução do potencial da água na folha, do turgor
270 celular, do conteúdo relativo de água, podendo afetar a área foliar e a absorção de
271 nutrientes (Farooq *et al.* 2009).

272 A Tabela 4 apresenta os valores de densidade estomática das variedades ao
273 serem retiradas do cultivo *in vitro* e na fase de aclimatização, ao fim de cada etapa em
274 diferentes coberturas. A literatura reúne diversos estudos que demonstram a grande
275 importância que tem a estrutura, morfologia e funcionalidade do aparato estomático
276 durante a aclimatização das plantas produzidas *in vitro*, já tendo sido registradas tanto
277 redução (Silva *et al.* 2006), como incremento (Bazaldúa-Muñoz *et al.* 2008) na
278 densidade estomática.

279 Todas as variedades apresentaram aumento gradual da densidade estomática
280 conforme o tempo de aclimatização, que coincidiu com o aumento da intensidade
281 luminosa no ambiente *ex vitro*. O cultivo *in vitro* das variedades ocorreu em biorreator
282 de imersão temporária, que proporciona benefícios na redução da umidade e
283 incrementos de CO₂, associado a uma aclimatização num gradiente progressivo de
284 intensidade luminosa e calor, contribuindo para um melhor desenvolvimento e
285 funcionalidade estomática. O aumento da densidade estomática das plantas
286 transplantadas para ambientes controlados e campo pode estar associado à economia de
287 água no ambiente *ex vitro*, já que folhas com mais estômatos funcionais apresentam
288 maior eficiência no uso da água e fixação de CO₂ (Costa *et al.* 2009).

289 O ganho percentual no número de estômatos por área foliar foi maior a partir do
290 30º dia de aclimatização, quando as plantas já haviam permanecido por 15 dias sem a
291 tela de sombreamento. Esta alteração mais acentuada nos primeiros dias de
292 aclimatização, já evidenciado por outros autores (Bazaldúa-Muñoz *et al.* 2008),
293 coincide com o próprio processo de aclimatização das plantas uma vez que durante o
294 cultivo sob sombreamento a intensidade luminosa era praticamente constante ao longo
295 do dia e representava pouca mais de 1/3 daquela a que foram submetidas as plantas nos
296 15 dias seguintes. Por outro lado, incremento na densidade estomática foi menos
297 expressiva dos 30 aos 45 dias, sugerindo que aos 45 dias as plantas já estavam
298 aclimatizadas e com o sistema estomático formado (Bazaldúa-Muñoz *et al.* 2008). A
299 densidade de estômatos é influenciada por condições ambientais, incluindo o estresse
300 hídrico, temperatura e luz (Xu & Zhou 2008). Observou-se, neste estudo, que a
301 incidência de luz foi um fator indutor do aumento da densidade estomática, e que estes
302 estômatos estavam funcionais, considerando o controle da perda de água evidenciado
303 pelo alto conteúdo hídrico relativo, discutido anteriormente.

304 No momento em que foram retiradas dos recipientes de cultivo *in vitro* as
305 plantas da variedade RB92579 apresentaram maior densidade estomática do que aquelas
306 das demais variedades, esta superioridade manteve-se também após 15 dias de
307 aclimatização, quando ainda estavam sob cobertura com sombreamento. A partir do 30º
308 dia de aclimatização, a variedade RB931011 que inicialmente apresentou menor número
309 de estômatos por área foliar, superou as demais variedades, em ambos os tratamentos.

310 O cultivo em um maior volume de substrato favoreceu o aumento na densidade
311 estomática das três variedades, embora só tenha sido registrada significância estatística
312 aos 15 dias, para as variedades RB92579 e RB98710 e, aos 30 dias, para RB98710.

313 Os teores de malondialdeído (MDA), um produto tóxico da peroxidação lipídica
314 em membranas, diferiram entre as variedades quando aclimatizadas e em função do
315 volume de substrato (Tabela 5). Trabalhos apontam que os níveis de MDA nas plantas
316 *in vitro* podem ser até três vezes maiores que naquelas aclimatizadas (Osório *et al.*
317 2013), mas neste trabalho observou-se que, para a variedade RB931011 o sistema de
318 cultivo *in vitro* não parece ter sido um fator de estresse tão severo quanto a
319 aclimatização em um volume de substrato de 55 cm³.

320 Em cana-de-açúcar, aumentos nos níveis de MDA são marcadores bioquímicos
321 bem consistentes de sensibilidade à seca que apresentam variações de acordo com a
322 variedade (Cia *et al.* 2012). Na aclimatização das plantas neste trabalho, o teor de MDA
323 mostrou-se uma variável indicadora da maior sensibilidade ao estresse para a variedade
324 RB931011.

325 A formação de H₂O₂ foi mais evidente em plantas sob cultivo *in vitro* do que nas
326 aclimatizadas. Outros autores também registraram níveis de H₂O₂ até três vezes maior
327 em plantas cultivadas *in vitro* quando comparadas com as aclimatizadas (Osório *et al.*
328 2013). Esta proporção foi verificada apenas em plantas da variedade RB931011 quando

329 aclimatizadas no menor volume de substrato. Nas demais variedades a proporção foi
330 inferior.

331 O teor H_2O_2 não variou na variedade RB92579 em função do volume de
332 substrato e aumentou na variedade RB931011 quando cultivada em 95 cm^3 de substrato,
333 enquanto que a variedade RB931011 respondeu ao aumento do volume de substrato
334 com uma menor produção de H_2O_2 em relação ao volume de 55 cm^3 (Tabela 5). Essa
335 variedade RB98710 apresentou maiores médias de H_2O_2 do que as demais, tanto na fase
336 *in vitro* quanto na aclimatização, sem, entretanto, comprometer o desempenho das
337 plantas aclimatizadas, como já discutido para os parâmetros biométricos. Já foi
338 amplamente evidenciado que o H_2O_2 tem um importante papel nas plantas sob
339 condições ambientais severas e que participa em muitos mecanismos de resistência
340 (Quan *et al.* 2008).

341 O alto teor de H_2O_2 nas mudas *in vitro* da variedade RB98710 contrasta com a
342 baixa atividade da SOD nessas plantas (Tabela 6). A SOD remove o $\cdot O_2^-$ formando
343 peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entretanto, nas plantas *in vitro* a atividade da SOD foi
344 inversamente proporcional ao teor de H_2O_2 , o que pode ser explicado pela dismutação
345 espontânea do $\cdot O_2^-$ que doa seu elétron a outro $\cdot O_2^-$ e é protonado a baixo pH,
346 resultando na geração não enzimática de H_2O_2 (Karuppanapandian *et al.* 2011). No
347 cultivo *in vitro*, o pH do meio é ajustado, em geral para 5,8, podendo sofrer redução a
348 partir da inoculação dos explantes e desenvolvimento dos propágulos.

349 Quando aclimatizadas, as plantas da variedade RB98710 apresentaram, em
350 relação às plantas *in vitro*, maior atividade da SOD, que foi acompanhada por valores
351 também superiores das atividades das enzimas APX e CAT. Na fase de aclimatização,
352 as variedades RB92579 e RB98710 apresentaram maior atividade da SOD que coincidiu

353 com as maiores médias de biomassa seca da parte aérea e radicular, discutido
354 anteriormente (Tabela 3).

355 O menor volume de substrato (55 cm³), que inibiu a produção de biomassa da
356 parte aérea e radicular, induziu uma maior atividade da SOD em todas as variedades. A
357 ativação da SOD é uma resposta ao aumento na formação do radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$)
358 para evitar seu acúmulo e consequente desequilíbrio redox com efeitos deletérios sobre
359 o metabolismo celular (Doullis *et al.* 1998). A limitação espacial para o
360 desenvolvimento do sistema radicular favoreceu uma condição estressante para as
361 plantas.

362 As atividades das enzimas CAT e APX apresentaram maiores médias nas plantas
363 *in vitro* do que naquelas já aclimatizadas e foi maior nas plantas da variedade
364 RB931011 do que nas demais variedades ao término do cultivo *in vitro* (Tabela 6). Não
365 se verificou efeito do fator volume de substrato sobre a atividade da CAT e APX, nem
366 houve diferença entre as variedades, na fase de aclimatização. A queda na atividade
367 dessas enzimas antioxidativas nas plantas aclimatizadas em relação à condição *in vitro*
368 demonstra que elas já haviam ajustado seu metabolismo ao novo ambiente, mantendo
369 sua capacidade produtiva com o sistema redox operando para manutenção do equilíbrio.
370 Possivelmente no processo de aclimatização as plantas estavam sendo submetidas a um
371 segundo ciclo de estresse e isso pode explicar a menor resposta da atividade do sistema
372 antioxidativo em plantas de moringa que, no primeiro ciclo de estresse hídrico máximo
373 apresentaram aumento das ROS, mas no segundo estresse máximo, a atividade da CAT
374 foi menor (Rivas *et al.* 2013).

375 A cana-de-açúcar demonstrou neste presente estudo que apresenta uma
376 versatilidade genotípica suficiente para se adaptar às mudanças ambientais inerentes ao
377 processo de transferência de um ambiente *in vitro* para o *ex vitro* e, além disso, como a

378 variedade e o volume de substrato aplicado podem favorecer no sucesso da
379 aclimatização. Com isso, as informações aqui apresentadas podem ser usadas para o
380 aprimoramento de protocolos de aclimatização de cana-de-açúcar.

381 **CONCLUSÕES**

382 As variedades RB98710 e RB92579 destacam-se na habilidade de manter o
383 equilíbrio pelo sistema redox, apresentam maior rusticidade estrutural, atingindo os
384 melhores resultados em biomassa seca, área foliar, conteúdo hídrico relativo, altura e
385 número de folhas e taxa de sobrevivência na aclimatização. O recipiente de 95 cm³ é o
386 mais indicado para a aclimatização e produção de mudas de cana-de-açúcar, em função
387 de promover melhores resultados em altura, massa seca aérea e radicular, área foliar,
388 além, de apresentar menores níveis de SOD, indicando que pode influenciar na redução
389 e equilíbrio do estresse nas mudas.

390 **AGRADECIMENTOS**

391 Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Laboratório de
392 Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da UFRPE, Laboratório de Anatomia Vegetal da
393 UFPE pela infraestrutura e apoio às pesquisas e ao Programa de Pós-Graduação em
394 Botânica da UFRPE por todo o conhecimento e facilitações.

395 **REFERÊNCIAS**

- 396 Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., Karanov E. The effect of drought and ultraviolet
397 radiation on growth and stress markers in pea and wheat. (2001) *Plant, Cell and*
398 *Environment*, **24**, 1337–1344.
- 399 Barrs H.D., Weatherley P.E. (1962) A re-examination of the relative turgidity technique
400 for estimating water deficits in leaves. *J. Biol. Sci.*, **15**, 413–428.
- 401
- 402 Bazaldúa-Muñoz C., Ventura-Zapata E., Salcedo-Morales G., Maldonado Amaya U.,
403 López García A. (2008). Densidad estomatal y potencial hídrico en plantas de tomate

- 404 (*Physalis ixocarpa* Brot.), propagadas por cultivo de meristemas. *Revista Chapingo*.
405 Serie horticultura, **14**, 147-152.
- 406
- 407 Berris L.S.J., Sizer I.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the
408 breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, **195**,
409 133-140.
- 410
- 411 Brachtvogel E.L., Malavasi U.C. (2010) Volume do recipiente, adubação e sua forma de
412 mistura ao substrato no crescimento inicial de *Peltophorum dubium* (sprengel) taubert
413 em viveiro. *Revista Árvore*, **34**, 223-232.
- 414
- 415 Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram
416 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*
417 *Biochemistry*, **72**, 248-254.
- 418 Bukatsch F. (1972) *Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin*.
419 *Mikrokosmos*, 61, 225 pp.
- 420
- 421 Cakmak I., Horst J. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide
422 dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*).
423 *Physiol. Plant*, **83**, 463–468.
- 424 Carvalho J.F., Tsimpho C.J., Silva E.F.F., Medeiros P.R.F., Santos M.H.V., Santos A.
425 N. (2012) Produção e biometria do milho verde irrigado com água salina sob frações de
426 lixiviação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **16**, 368-374.
- 427
- 428 Cia M.C., Guimarães A.C.R., Medici L.O., Chabregas S.M., Azevedo R.A. (2012)
429 Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and sensitive sugarcane
430 varieties. *Ann Appl Biol*, **161**, 313–324.
- 431 Costa F.H.S., Pereira J.E.S., Pasqual M., Castro E.M., Santos A.M. (2009) Perda de
432 água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas
433 durante a aclimatização. *Revista Ciência Rural*, **39**, 742-748.
- 434 Dias M.C., Pinto G., Santos C. (2011). Acclimatization of micropropagated plantlets
435 induces an antioxidative burst: a case study with *Ulmus minor*
436 Mill. *Photosynthetica*, **49**, 259-266.
- 437 Díaz-Pérez J.C., Sutter E.G., Shackel K.A. (1995) Acclimatization and subsequent gas
438 exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after
439 transplanting them in soil. *Physiologia Plantarum*, **95**, 225-232.
- 440
- 441 Dobránszki J., Silva J.A.T. (2010) Micropropagation of apple - A review. *Biotechnol*
442 *Adv*, **28**, 462-488.
- 443

- 444 Doulis A.G., Donahue J. L., Alscher R.G. (1998). Differential responses to paraquat-
445 induced oxidative injury in a pea (*Pisum sativum*) protoplast system. *Physiologia*
446 *Plantarum*, **102**, 461-471.
447
- 448 FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Faostat. Disponível em:
449 <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>. Acesso em: 04 out, 2013.
450
- 451 Farooq M., Wahid A., Kobayashi D., Fujita D, Basra S.M.A. (2009) Plant drought stress
452 effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, **29**,
453 185-212.
454
- 455 Gerald L.T.S., Lee L.L. (2011) Biofabrica e sua influência na produtividade de cana-de-
456 açúcar. In: Gerald L.T.S (Eds), Biofabrica de plantas. Antiqua, São Paulo, Brasil, pp
457 118-133.
458
- 459 Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977) Superoxide dismutases: Occurrence in higher
460 plants. *Plant Physiol*, **59**, 309–314.
- 461 Karuppanapandian T., Moon J., Kim C., Manoharan K., Kim W. (2011) Reactive
462 oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging
463 mechanisms, *Aust J Crop Sci*, **5**, 709-725.
464
- 465 Medeiros D.C., Marques L.F., Dantas M., Da Silva R., Moreira J.N., Azevedo C.M.D.S.
466 (2010). Produção de mudas de meloeiro com efluente de piscicultura em diferentes tipos
467 de substratos e bandejas. *Rev. Bras. de Agroecologia*, **5**, 65-71.
- 468 Menezes T., Santos T., Arrigoni M., Blank A. (2012) Embriogênese somática de
469 variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* Spp.). *Revista GEINTEC: Gestão,*
470 *Inovação e Tecnologias*, **2**, 32-41.
- 471 Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with
472 tobacco tissue cultures. *Physiological Plant*, **15**, 473-497.
473
- 474 Nakano Y., Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific
475 peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, **22**, 867–880.
476
- 477 Osório M.L., Gonçalves S., Coelho N., Osório J., Romano A. (2013) Morphological,
478 physiological and oxidative stress markers during acclimatization and field transfer
479 of micropropagated *Tuberaria major* plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,
480 **115**, 85-97.
- 481 Quan L.J., Zhang B., Shi W.W., Li H.Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: a
482 versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of integrative plant*
483 *biology*, **50**, 2-18.

- 484 Rivas R., Oliveira M.T., Santos M.G. (2013). Three cycles of water deficit from seed to
485 young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant*
486 *Physiology and Biochemistry*, **63**, 200-208.
- 487 Rocha E.L.J., Carvalho A.C.P.P.D., Azevedo B.M.D., Marinho A.B., Viana T.V.D.A.,
488 Vasconcelos D.V. (2009) Acclimatization of micropropagated heliconia plants in
489 different substrates. *Ciência e Agrotecnologia*, **33**, 1457-1462.
- 490
- 491 Rocha P.S.G., Oliveira R.P., Scivittaro W.B. (2013) Sugarcane micropropagation using
492 light emitting diodes and adjustment in growth-medium sucrose
493 concentration. *Cienc.Rural*, **43**, 1168-1173.
- 494 Santos E.M.D., Azevedo B.M.D, Marinho, A.B., Carvalho A.C.P.P.D., Saraiva K.R.
495 (2013) Acclimatization of micropropagated seedlings of Torch Lily in containers of
496 different capacities. *Revista Ceres*, **60**, 134-137.
- 497 Shi K., Ding X.T., Dong D.K., Zhou Y.H., Yu J.Q. (2008) Root restriction-induced
498 limitation to photosynthesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves. *Scientia*
499 *Horticulturae*, **117**, p.197-202.
- 500 Silva E.M., Lima J.E.F.W., Azevedo J.A., Rodrigues L.N. (2006) Valores de tensão na
501 determinação da curva de retenção de água de solos do Cerrado. *Pesq. agropec. bras.*,
502 **41**, 323-330.
- 503 Strasburger E. (1924) *Handbook of Practical Botany*. London, George Allen & Nonwin,
504 Ltd, 533 pp.
- 505
- 506 Taveira J.A.M. (2011) Novas tecnologias na aclimatização, formação e manejo de
507 mudas. In: Gerald L.T.S (Eds), *Biofabrica de plantas*. Antiqua, São Paulo, Brasil, pp
508 245 - 267.
- 509 Wien H.C. (1997) The cucurbits: cucumber, melon, squash and pumpkin. In: Wien,
510 H.C. (Eds.), *The physiology of vegetable crops*. Oxford: CAB International, 1997,
511 Oxford, New York, USA, pp .345-386.
- 512
- 513 Xu Z., Zhou G. (2008). Responses of leaf stomatal density to water status and its
514 relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 3317-
515 3325.

TABELA

Tabela 1. Variação da intensidade luminosa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ao longo do dia nos três ambientes de cobertura (sombrite 70%, plástico e sol pleno) utilizados na aclimatização de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar das variedades RB931011, RB92579 e RB98710

	Sombrite (70%)	Plástico	Sol Pleno
9h	224	583	1000
12h	241	796	1250
15h	237	422	574



Tabela 2. Altura média das plantas (AP) e número médio de folhas de mudas (NF) das variedades de cana-de-açúcar RB931011, RB92579 e RB98710, aos 15, 30 e 45 dias de aclimatização em diferentes volumes de substrato (55 cm³ e 95 cm³)

Var	AP (cm)						NF					
	15		30		45		15		30		45	
	55	95	55	95	55	95	55	95	55	95	55	95
	(cm ³)											
RB931011	9,73 cA	10,13 cA	18,67 bB	22,92 bA	44,37 cA	44,77 bA	2,30 aA	2,10 bA	3,30 bA	3,50 bA	4,75 cA	4,60 cA
RB92579	12,48 aA	12,48 aA	27,19 aA	28,00 aA	51,00 bB	57,83 aA	2,15 aA	2,25 bA	4,60 aA	4,20 aA	5,65 aA	5,85 aA
RB98710	11,65 bA	11,60 bA	29,17 aA	29,47 aA	55,85 aA	57,75 aA	2,25 aB	2,60 aA	4,25 aA	4,65 aA	5,35 bA	5,45 bA
CV(%)	8,42		12,43		8,89		21,33		18,28		9,91	

As médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada período (15; 30 ou 45 dias) não diferem estatisticamente entre si. Colunas - letras minúsculas (compara variedades entre si) e linhas - letras maiúsculas (compara volumes entre si). Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 3. Massa seca total das plantas micropropagadas (MSt), massa seca da parte aérea (MSa), massa seca radicular (MSr), área foliar (AF) e coeficiente hídrico relativo (CHR) das variedades de cana-de-açúcar (RB931011, RB92579 e RB98710) aos 45 dias de aclimatização em diferentes volumes de substrato (55 cm³ e 95 cm³)

Var	MSt (g)	MSa (g)		MSr (g)		AF (cm ²)		CHR	
	<i>In vitro</i>	55 (cm ³)	95 (cm ³)	55 (cm ³)	95 (cm ³)	55 (cm ³)	95 (cm ³)	55 (cm ³)	95 (cm ³)
RB931011	0.02616 b	0,54 bB	0,92 cA	0,13 bA	0,16 bA	93,00 bA	93,3 cA	97,30 aA	97,87 aA
RB92579	0.03202 a	1,05 aB	1,29 bA	0,29 aB	0,41 aA	156,0 aB	248,3 aA	96,65 aA	97,43 aA
RB98710	0.02852 b	0,93 aB	1,49 aA	0,29 aB	0,46 aA	165,8 aB	208,7 bA	97,11 aA	97,11 aA
CV(%)		18,41		27,16		16,24		1,23	

As médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada período (15; 30 ou 45 dias) não diferem estatisticamente entre si. Colunas - letras minúsculas (compara variedades entre si) e linhas - letras maiúsculas (compara volumes entre si). Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 4. Densidade estomática (mm^2) dos segmentos foliares das variedades de cana-de-açúcar (RB931011, RB92579 e RB98710) sob cultivo *in vitro* e aos 15, 30 e 45 dias de aclimatização em diferentes volumes de substrato (55 cm^3 e 95 cm^3)

Variedade	<i>In vitro</i>	15 dias		30 dias		45 dias	
		55 cm^3	95 cm^3	55 cm^3	95 cm^3	55 cm^3	95 cm^3
RB931011	156,25 b	165,75 bA	162,5 cA	353,12 aA	356,25 aA	415,62 aA	406,25 aA
RB92579	218,75 a	234,37 aB	278,12 aA	315,62 bA	290,62 bA	359,37 bA	381,25 bA
RB98710	159,37 b	181,25 bB	228,12 bA	278,12 cB	337,50 aA	331,25 bA	362,50 bA
CV	10,66	7,76		6,07		6,48	

As médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada período (15; 30 ou 45 dias) não diferem estatisticamente entre si. Colunas - letras minúsculas (compara variedades entre si) e linhas - letras maiúsculas (compara volumes entre si). Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 5. Teores de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em variedades de cana-de-açúcar (RB931011, RB92579 e RB98710) *in vitro* e aos 45 dias de aclimatização em diferentes volumes de substrato (55 cm³ e 95 cm³)

Variedade	MDA ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}^{-1}$)			H ₂ O ₂ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}^{-1}$)		
	<i>In vitro</i>	Aclimatizadas		<i>In vitro</i>	Aclimatizadas	
		55 cm ³	95cm ³		55 cm ³	95cm ³
RB931011	2.23656 a	3.4194 aA	2.3011 aB	0.63423 b	0.2046 bB	0.3861 bA
RB92579	1.78495 a	1.1183 bB	2.0215 aA	0.65238 b	0.3074 bA	0.2469 bA
RB98710	2.19355 a	1.6774 bA	1.6129 aA	1.06996 a	0.8824 aA	0.6161 aB

As médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada período (15; 30 ou 45 dias) não diferem estatisticamente entre si. Colunas - letras minúsculas (compara variedades entre si) e linhas - letras maiúsculas (compara volumes entre si). Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade



Tabela 6. Atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em variedades de cana-de-açúcar (RB931011, RB92579 e RB98710) *in vitro* e aos 45 dias de aclimatização em diferentes volumes de substrato (55 cm³ e 95 cm³)

Variedade	SOD		CAT		APX	
	(U SOD mg prot. ⁻¹)		(μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot.)		(μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot.)	
	<i>In vitro</i>	Aclimatizada	<i>In vitro</i>	Aclimatizada	<i>In vitro</i>	Aclimatizada
RB931011	29,51 a	10.32 b	77,53 a	13,11 a	769,12 a	126,54 a
RB92579	15,13 b	18.10 a	39,54 b	13,91 a	622,63 a	127,30 a
RB98710	11,37 b	20.12 a	29,64 b	15,60 a	430,22 a	159,33 a

Volume de Substrato	SOD		CAT		APX	
	(U SOD mg prot. ⁻¹)		(μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot.)		(μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot.)	
	Aclimatizada		Aclimatizada		Aclimatizada	
55 cm ³	18.52 a		14.31 a		125,18 a	
95 cm ³	13.84 b		14.11 a		150,26 a	

As médias seguidas pela mesma letra, dentro de uma mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



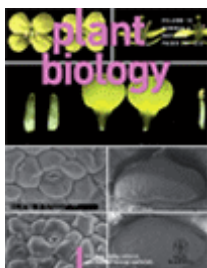
5 – ANEXOS



You have full text access to this content

Plant Biology

©German Botanical Society and the Royal Botanical Society of the Netherlands



Edited By: Heinz Rennenberg and J.T.M. Elzenga

Impact Factor: 2.32

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 56/197 (Plant Sciences)

Online ISSN: 1438-8677

Author Guidelines

Downloads: [Colour Work Agreement Form](#), [Page Charge Form](#).

Supplementary Material: Authors are encouraged to provide additional information as supplementary material that will be accessible online. Please identify the supplementary material as such in the manuscript.

Editorial Policy

Plant Biology publishes research results from all fields of plant science. Manuscripts must be of general interest, not only addressed to a specialized readership. The journal encourages publications with an interdisciplinary approach.

Plant Biology accepts

1. Problem-oriented original research papers (maximum 9000 words)
2. Problem-oriented short research papers (maximum five printed pages)
3. Concise review articles
4. Acute views, i.e., comments on actual problems and provocative opinion articles.

Purely descriptive papers will not be accepted. The Editors welcome contributions from all over the world.

Submission of Manuscripts

Please submit your manuscript online at [ScholarOne Manuscripts](#) (*Plant Biology* no longer accepts submissions made by post or e-mail).

To submit a manuscript through ScholarOne Manuscripts, please follow these instructions:

1. If you do not yet have an account, go to <http://mc.manuscriptcentral.com/plabio> and click on 'Create Account'. You will then be sent a password by e-mail. If you already have an account, enter your user ID and password and click on 'Log In'. (Note: if necessary you can change your password under 'Edit My Account'.)
2. On the welcome page, click on 'Corresponding Author Center'.
3. You then reach the 'Author Center Dashboard', click on the star icon for manuscript submission.
4. Follow the steps 1-7 until manuscript submission is completed. The main document including title, abstract, key words (MS Word file), tables (MS Word files) and figures (*.eps, *.tif or *.jpg files) are loaded onto the system as individual files. The text should be written double spaced and with line numbering. (Note: you may also interrupt the online submission and continue at a later time.) Authors are encouraged to provide additional information as Supporting Information that will be accessible online.
5. **Fast-Track Publication:** *Plant Biology* offers special handling of manuscripts that have been rejected from very high-level journals. Authors are encouraged to enclose the original manuscript, the reviews plus the comments from the editor, and the revised manuscript of previously reviewed manuscripts to expedite their handling as your manuscript may be accepted based on the previous reviews. Please also include a letter with a point by point response to the concerns raised by the reviewer(s). You will receive a final decision from the Managing Editor within a few days of submitting manuscripts with reviews.
6. Authors should address the following points in their cover letter. 1. What are the aims and hypothesis of their paper?; 2. What new achievements or innovations do they present?; 3. What is the general significance of their paper and why is it timely?
7. Submission of your manuscript will be confirmed by an e-mail that will give you the 'Manuscript ID Number'. Please refer to this number in all correspondence with the editorial office. With your submission, you guarantee that all co-authors agree with the submission of the manuscript.

Should you encounter difficulties submitting a manuscript to ScholarOne Manuscripts, please contact the editorial office by e-mail at annette.schlierenkamp@ctp.uni-freiburg.de or by telephone ++49(0)761/203-8300. Help is also available on the introductory page of ScholarOne Manuscripts in the form of an 'Online User's Guide'. To access the guide, click on 'Get Help Now' in the top right-hand corner.

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com.ez19.periodicos.capes.gov.br/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Conditions for Publication

Research papers may be submitted that have not been published previously, even as a summary. Concise presentation is required. Although the non-specialist reader should be kept in mind when abstracts, introductions and discussions are written, lengthy review type introductions and speculative discussions should be avoided. Experimental methods should be explained in detail except for standard

procedures. Diffuse and repetitive style should be avoided. Illustrations and tables should be limited to the truly essential material.

Plant Biology preferentially publishes **short research papers** (five printed pages maximum) that will be reviewed with high priority.

Concise review articles that synthesize the state of the art in an original way are highly desirable for this journal.

Acute views contributions should contain brief comments on an actual problem (2-3 printed pages).

CrossCheck for plagiarism: All submissions will be run through CrossCheck to identify any plagiarism. If an author is found to have plagiarized all or parts of his or work, the author's institute will be notified of the breach of scientific conduct.

New: Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscripts professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com.ez19.periodicos.capes.gov.br/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Length of Papers

Papers should not exceed 8 printed pages or 9,000 words. One printed page in the journal (without figures and tables, with about 3 subheads and paragraphs) usually contains roughly 6200 characters. The number of figures plus tables should not exceed 9. Appendices will be published as Supporting Information rather than in the main text.

References: About 40 to 50 references usually fill one printed page.

Page Charges: Original research papers longer than the guidelines given above when in proof are subject to a page charge at a rate of €125 per page above the 8-page limit (first 8 pages are free of charge). An invoice will be sent to authors for these charges upon print publication of their article. Invited and review articles are excluded from this rule.

Arrangement

Research papers

Title page: The first page of each paper should indicate: The title, the authors' names and affiliations, a short title for use as running head, the name, address, e-mail address, phone and fax number of the corresponding author, and 3 to 7 keywords.

Abbreviation: List with abbreviations where appropriate.

Abstract: The abstract must not exceed 250 words. It should include the hypothesis, explain the novelty of the work, and what it adds to the body of scientific knowledge.

The following sections cover the usual contents: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References (see below), Tables (see below), Figure legends (see below), Illustrations (see below).

In Materials and Methods, Results and Discussion subheadings are possible. If an author chooses to combine sections Results and Discussion, an additional section Conclusions can be added, but this must be brief.

Concise review articles

Choose subheadings as appropriate but do not use a numbering system. Title page, Key words, Abstract and other items as for full length papers.

Tables

Tables must be serially numbered in Arabic numerals and each must carry a brief descriptive heading. Tables reproduced from other publications must state their precise source. Only signs that can be typeset should be used in the tables and legends. Please provide Tables in Word and include them at the end of the manuscript after the References, each on a separate page. Refrain from using both tables and graphs to demonstrate the same results.

Figures and Graphics

Electronic artwork

It is essential that all artwork is provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Post-script (EPS) format and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image Format (TIFF). Detailed information on our digital illustration standards is available at <http://authorservices.wiley.com.ez19.periodicos.capes.gov.br/bauthor/illustration.asp>.

Please do not embed any tables and/or figures in the text document.

If you should encounter difficulties upon submitting figures and graphics, please contact the editorial office by e-mail under annette.schlierenkamp@ctp.uni-freiburg.de or by telephone under ++ 49/(0)761/203-8300.

Colour illustrations

Authors are required to cover the cost of colour printing at €300 per article + VAT. If you require artwork to be reproduced in colour in the print version, please complete the [colour work agreement form](#) and return to the address on page 2 of the form. Artwork reproduced in colour online but black and white in print is free of charge. In these instances authors should write their legend to accommodate both versions. Please supply colour work as eps, tiff or jpg files.

Please address any queries in relation to colour reproduction to the Production Editor (plb@wiley.com).

References

The list of references must include all (but no additional) references quoted. Arrange references alphabetically according to author name, not chronologically. The name of the journals containing the cited papers should be given in full. Town/city and country names should be provided for non-journal refs.

Each article reference should be given as in the following example:

Alfano J.R., Collmer A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defence. *Annual Review Phytopathology*, **42**, 385–414.

Books or other non-serial publications which are quoted in the references must be cited as follows:

Gage J.D., Tyler P.A. (1991) *Deep-sea Biology: A Natural History of Organisms at the Deep-sea Floor*. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 504 pp.

Lester R.N., Hasan S.M.Z. (1991) Origin and domestication of the brinjal eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum*, in Africa and Asia. In: Hawkes J.G., Lester R.N., Nee M., Estrada N. (Eds), *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew; London, UK: 369-387.

Articles not yet published may only be cited if they have definitely been accepted for publication. They must be denoted by the expression 'in press'.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

Units

Plant Biology will follow the system of SI units (Système International d'Unités). Within a given paper chosen units must be uniform.

Abbreviation

Note that common abbreviations can be used without explanation. Others must be explained. In case of doubt always give an explanation. Use FW = fresh weight and DW = dry weight.

Scientific Names

Scientific names should be cited in their complete form when first mentioned with genus - species - authority - cultivar (cv.) or subspecies (ssp.) where appropriate. Latin names should be underlined or typed in *italics*. Subsequently the generic names should be abbreviated, but avoid confusion: e.g. use *A. comosus* if the only genus with a first letter A in your paper is *Ananas*; but use unambiguous abbreviations if you have more than one genus with the same first letter, e.g. *Ananas comosus*, *Aechmea nudicaulis* = *A. comosus*, *Ae. nudicaulis*, etc. Common names of organisms must be accompanied by the correct scientific name when first mentioned. For rare or exotic genera it may be useful to give the name of the family and/or higher taxon in brackets when first mentioned.

Copyright

Authors will be required to assign copyright of their paper to the German Botanical Society, Royal Botanical Society of the Netherlands and Blackwell Publishing. Copyright assignment is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright should tick relevant box on the form). The publishers will not refuse any reasonable request by authors for permission to reproduce their contributions to the journal.

Reprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. The corresponding author will be asked to provide up to seven email addresses for early distribution of a PDF offprint by the publisher. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for the printed offprints to take up to 8 weeks to arrive after publication of the journal. For further information please contact C.O.S. Printers PTe Ltd, 9 Kian Teck Crescent, Singapore 628875; Fax: +65 6265 9074; E-mail: offprint@cosprinters.com.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, the Publisher will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible after the final decision about publication.

Production

You will receive a proof of your article approximately 4 weeks after acceptance. The proof will contain instructions on how to return corrections and answers to the queries listed at the end of the proof. Please note that the journal does not accept e-annotated PDFs. Please submit hand-written or typed modifications only.

Last update: February 2013

