

GILENO VITOR MOTA LIMA

AÇÃO DE AUXINAS E COFADORES FENÓLICOS NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum L.*)

RECIFE, PE

FEVEREIRO DE 2010

GILENO VITOR MOTA LIMA

AÇÃO DE AUXINAS E COFADORES FENÓLICOS NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

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

ORIENTADORA: Dra TEREZINHA RANGEL CAMARA

CO-ORIENTADORAS:

Dra LILIA GOMES WILLADINO

Dra CLÁUDIA ULISSES

RECIFE, PE

FEVEREIRO, 2010

Ficha catalográfica

L732a Lima, Gileno Vitor Mota
Ação de auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento
in vitro de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum
officinarum* L.) / Gileno Viitor Mota Lima. -- 2010.
96 f. : il.

Orientadora: Terezinha Rangel Câmara.
Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia,
Recife, 2010.
Inclui referências e anexo.

1. Ácido cafeico 2. Floroglucinol 3. Reguladores de crescimento
4. Micropropagação I. Câmara, Terezinha Rangel II. Título

CDD 581.1

GILENO VITOR MOTA LIMA

AÇÃO DE AUXINAS E COFADORES FENÓLICOS NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora:

Orientadora: Prof^ª. Terezinha Rangel Camara, Dra.
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Examinadores:

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

Prof^ª. Josabete Salgueiro Bezerra de Carvalho, Dra.
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^ª. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares, Dra.
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^ª. Tânia Maria Sarmento da Silva, Dra.
Universidade Federal Rural de Pernambuco

RECIFE, PE

FEVEREIRO, 2010

DEDICATÓRIA

Faço deste trabalho uma homenagem à minha mãe Maria Vitória Mota. Dedico também à meu pai Geraldo Pereira Lima (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Para se chegar a algum lugar, independente da distância a se percorrer, é preciso saber onde se está e onde se quer chegar, dar o primeiro passo. E em cada passo dado nessa nossa jornada encontramos pessoas que têm alguma importância, mesmo que não saibamos reconhecê-la de imediato. Não se caminha ou se chega a algum lugar sozinho. Gostaria de deixar registrado que seria impossível citar todas as pessoas que tiveram importância desde o início da minha formação profissional e pessoal, porém sei o quão importante foram e são para mim e espero poder agradecer, de alguma forma, a cada uma delas.

Grato a Deus pela vida e por tudo.

A Deus novamente, por conceder-me uma família a qual posso amar e ser fortalecido na reciprocidade do mesmo amor, por ser sempre tão incentivadora e entender minha ausência por tantos anos. À minha mãe, Maria Vitória Mota que, com o carinho de mãe e de pai, ao longo de minha vida me transmitiu lições de honestidade, respeito e perseverança (você é meu maior exemplo de força);

A minha querida orientadora, Profa. Terezinha Camara, pela confiança depositada, acolhida, incentivo, ensinamentos, amizade, apoio, estímulo... enfim por tudo!

As Professoras Lília Willadino e Cláudia Ulisses pela co-orientação, pelas valiosas colaborações e amizade.

A Gilvany Rodrigues de Andrade, minha noiva que sempre esteve ao meu lado me dando todo o carinho, amor e apoio que precisei.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco representado pela coordenadora Dra. Carmem Sílvia Zickel.

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

Ao CETENE (Biofábrica Miguel Arraes) pela concessão das mudas de cana-de-açúcar.

Aos estagiários e bolsistas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pelos momentos de trabalho e descontração (Gemima, Luciana, Ronaldo, João Alves, Marina, Patrícia Cunha, Manu, Jaislanny).

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

Aos amigos de longa data, Tiago (praticamente irmão), Andrea, Roberto César, Vanessa Rocha.

Aos amigos Deivid Almeida e Emmanuel Cabral companheiros de trabalho e descontração.

Ao povo brasileiro, principalmente à massa trabalhadora e aos que não tiveram oportunidades de estudo, que no compromisso do pagamento de seus impostos, torna possível a educação formal de tantos outros brasileiros.

Como havia predito, várias pessoas estiveram envolvidas neste trabalho, não só de forma diretamente científica ou na labuta do trabalho, mas também muitas que contribuíram de forma significativa, cada uma ao seu modo e em seu momento, para que este trabalho obtivesse êxito.

Muito obrigado mesmo!!

SUMÁRIO

Pág.

LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Aspectos históricos, botânicos e socioeconômicos da cana-de-açúcar	15
2.2 Micropropagação da cana-de-açúcar	17
2.2.1 Etapas da micropropagação	18
2.2.2 Reguladores e ciclos de multiplicação	18
2.2.3 Enraizamento <i>in vitro</i>	20
2.2.4 Auxinas e compostos fenólicos	21
2.3 Estresse <i>in vitro</i> e formação de ROS	22
2.4 Metabolismo anti-oxidativo	24
3. Referências	25
4. MANUSCRITO 1	30
Efeito das auxinas no enraizamento <i>in vitro</i> de variedades de cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	31
Resumo	31
Abstract	32
Introdução	32
Materiais e Métodos	34
Resultados e Discussão	36
Conclusões	42
Referências	43

SUMÁRIO (Cont.)

Pág.

5. MANUSCRITO 2	46
Interações entre auxinas e Cofatores fenólicos no enraizamento <i>in vitro</i> de variedade de cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	47
Abstract	47
Resumo	48
Introdução	48
Materiais e Métodos	50
Resultados e Discussão	54
Conclusões	78
Referências	79
6. Anexos	87

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Efeito das auxinas no enraizamento *in vitro* de variedades de
cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

Tabela 1. Percentual de enraizamento das variedades de cana-de-açúcar RB 92579 e RB 872552 após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com distintas concentrações de AIA ou AIB.

Tabela 2. Índice de velocidade de iniciação de enraizamento (IVE) *in vitro* (Interação Genótipos \times Auxinas) de duas variedades de cana-de-açúcar cultivadas em meio MS acrescido com distintas concentrações de AIA ou AIB (0, 1,5 e 3,0 μ M)

Tabela 3. Número de folhas das variedades de cana-de-açúcar RB 92579 e RB 872552 aos 10, 15 e 20 dias de cultivo em meio MS com distintas concentrações de AIA ou AIB.

MANUSCRITO 2

Interações entre auxinas e Cofatores fenólicos no enraizamento *in vitro* de
variedade de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

Tabela 1. Percentual de enraizamento da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μ M de AIA ou AIB em combinação com distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol (1,5 μ M e 3,0 μ M) e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 2. Comprimento (cm) do sistema radicular da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μ M de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 3. Peso fresco (g) radicular da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μ M de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 4. Comprimento (cm) da parte aérea da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μ M de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 5. Peso fresco (g) da parte aérea da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 6 Número de perfilhos da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 7. Número de perfilhos enraizados da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 8. Número de folhas da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 9. Teor de fenóis totais expresso mg/g de tecido vegetal fresco da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 10. Atividade da peroxidase (POD) expressa em U/mg de proteína da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 11. Atividade da Polifenoloxidase (PPO) expressa em U/mg de proteína da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Tabela 12. Atividade da Catalase (CAT) expressa em U/mg de proteína da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha) (Interação reguladores X Compostos fenólicos).

Tabela 13. Atividade da Catalase (CAT) expressa em U/mg de proteína da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha) (Interação reguladores X Interação partes da planta).

Tabela 14. Atividade da Catalase (CAT) expressa em U/mg de proteína da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha) (Interação partes da planta X Compostos fenólicos).

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1(A) Estrutura química do Ácido indol-3-acético; (B) Estrutura química do Ácido indol-3-butírico.

Figura 2 (A) Estrutura química do ácido cafeico; (B) Estrutura química do floroglucinol.

MANUSCRITO 1

Efeito das auxinas no enraizamento *in vitro* de variedades de
cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

Figura 1 – Desenvolvimento radicular das variedades RB 92579 (a - e) e RB-872552 (f - j) durante o cultivo *in vitro* em meio MS com distintas concentrações de AIA e AIB (0, 1,5 e 3,0 μM), aos 20 dias de cultivo.

Figura 2. Índice de velocidade de iniciação de enraizamento (IVE) *in vitro* (interação Genótipos \times Tempo de tratamento) de duas variedades de cana-de-açúcar cultivadas em meio MS acrescido com distintas concentrações de AIA ou ANA (0, 1,5 e 3,0 μM).

Figura 3. Número de perfilhos das variedades de cana-de-açúcar RB 92579 e RB872552 aos 10, 15 e 20 dias de cultivo em meio de enraizamento MS com distintas concentrações de AIA e AIB (0, 1,5 e 3,0 μM).

Figura 4. Número de perfilhos das variedades de cana-de-açúcar RB 92579 e RB872552 aos 10, 15 e 20 dias de cultivo em função da concentração de AIA e AIB (0, 1,5 e 3,0 μM) em meio de enraizamento MS.

MANUSCRITO 2

Interações entre auxinas e Cofatores fenólicos no enraizamento *in vitro* de variedade de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

Figura 1. Percentual de enraizamento (A), nº de folhas (B) e nº de perfilhos (C) da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Figura 2. Desenvolvimento radicular da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Figura 3. Índice de velocidade de enraizamento (IVE) da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 do ao 24º dia de cultivo em meio MS acrescido de distintas combinações de 3,0 µM de AIA ou AIB com ácido cafeico ou floroglucinol, a 1,5 ou 3,0 µM e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Figura 4. Comprimento da parte aérea da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Figura 5. Teor de fenóis (A), Atividade específica da peroxidase (B) e Atividade da polifenoloxidase (C) da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol em ausência desses constituintes (Testemunha).

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar foi uma das primeiras culturas industriais a ser micropropagada em escala comercial (World Sugar Statistics, 2005). Os primeiros trabalhos de cultivo *in vitro* com cana-de-açúcar datam da década de sessenta do século passado, com registros de regeneração de plantas a partir de calos (Nickell, 1964; Barba & Nickell, 1969; Heinz & Mee, 1969). A micropropagação massiva é atualmente usada para a multiplicação de novas variedades em muitos países produtores de cana-de-açúcar. A partir do lançamento de novas variedades, a disponibilização em larga escala do material melhorado é uma etapa crucial para a implantação de cultivos com os genótipos elite.

O uso de mudas com alto padrão de qualidade pode contribuir para expressivos ganhos da produtividade agrícola que são essenciais para manter o Brasil como maior produtor e exportador de açúcar e álcool (etanol) oriundos da cana-de-açúcar. A propagação vegetativa *in vitro* reúne as vantagens da produção de mudas de cana-de-açúcar de alto padrão fitossanitário e em reduzido espaço de tempo (Hendre, 1983; Torres et al., 1998; Pereira & Fortes 2003; Aamir Ali et al., 2008).

A indução e o desenvolvimento do sistema radicular durante o cultivo *in vitro* é um dos obstáculos no estabelecimento de um protocolo de micropropagação. O desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condição *in vitro* ou *in vivo* é um processo de grande complexidade que envolve fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente elucidados (Souza & Pereira, 2007). Ao longo do enraizamento adventício (indução, iniciação e alongamento) a concentração de auxina endógena sofre oscilações, reflexo da atividade enzimática, sendo necessária suplementação com auxinas sintéticas. O alto nível de auxinas endógenas pode ser necessário para a iniciação de raízes adventícias primordiais. Existe uma relação intrínseca entre os níveis de auxina endógena e a habilidade para iniciar raízes (Gaspar & Hofinger, 1988).

Além das auxinas, outras substâncias também foram avaliadas e apontadas como importantes para o enraizamento, como alguns compostos fenólicos, dentre os quais se destacam o ácido cafeico e o floroglucinol (Deklerk et al., 1999; Gur et al., 1988; McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Lima, 1998; Assis & Teixeira, 1998;

Aloufa, 2003). O acúmulo desses fenólicos, entretanto, pode inibir o processo de enraizamento (Trobeck et al., 2005) e favorecer a ocorrência de estresse oxidativo pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS - O_2 ; H_2O_2 ; OH^\cdot ; HO_2^\cdot) as quais podem acarretar danos celulares, embora em baixas concentrações, algumas atuem como moléculas sinalizadoras em processos de crescimento e desenvolvimento celular (Del Río et al., 2006). As plantas dispõem de um complexo sistema antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes capazes de prevenir o excesso de ROS e o estresse oxidativo (Saher, et al., 2004; Dewir et al, 2006).

O estabelecimento de estresse oxidativo *in vitro* é decorrente das condições de cultivo que envolvem aspectos do ambiente físico, químico e gasoso dos recipientes (Kozai et al., 1997). Postula-se que problemas como perda da capacidade morfogênica, podem ser decorrentes de, ou estar relacionado a danos causados por estresse oxidativo imposto ao tecido vegetal durante o cultivo *in vitro* (Cassells & Cury, 2001). De acordo com Bray et al. (2000), o fracasso em compensar um estresse severo pode resultar em perda total da totipotência organogênica e, finalmente, morte da planta ou da célula.

A capacidade de manter o nível adequado das ROS em resposta a indutores de enraizamento exógenos pode ser um importante diferencial na obtenção de mudas bem formadas e em melhores condições para aclimatização. A manutenção da capacidade propagativa e do crescimento da parte aérea deve ser assegurada durante o processo de enraizamento *in vitro*. Dessa forma, no estabelecimento de protocolos de enraizamento *in vitro*, as variáveis de crescimento associadas a indicadores de estresse e de defesa antioxidativa podem ser utilizadas no processo de avaliação e ajuste metodológico.

Algumas variedades de cana-de-açúcar são recalcitrantes à indução do enraizamento *in vitro*, como a RB92579, atualmente a mais cultivada no Nordeste, ocupando 30% da área plantada (Almeida et al., 2008). Assim sendo, estudou-se a ação de auxinas e compostos fenólicos sobre o enraizamento *in vitro* dessa variedade e da variedade RB872552, boa formadora de raízes. Avaliou-se também o efeito do número de subcultivos sobre a capacidade rizogênica desses genótipos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS, SÓCIOECONÔMICOS E BOTÂNICOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no século XVII com o objetivo de quebrar o monopólio mundial exercido pela França no comércio com o açúcar produzido nas Ilhas do Caribe. Atualmente a cana-de-açúcar ocupa uma área de mais de quatro milhões de hectares no panorama brasileiro e o Brasil consolidou-se como o maior produtor e exportador do mundo. Hoje, o Brasil foi o primeiro país do mundo a implantar, em grande escala, um combustível renovável alternativo ao petróleo (UNICA, 2008). Na região Nordeste, o estado de Alagoas responde pela produção majoritária (17 milhões de toneladas de cana-de-açúcar) e Pernambuco, com 9 milhões de toneladas, é o segundo colocado (FAO, 2009).

O aumento na produtividade no Nordeste vem sendo assegurado pela incorporação de novas variedades obtidas por meio do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar, o PGMCA, desenvolvido pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA. Na primeira década deste século quatro novas variedades vêm se destacando no Nordeste, todas oriundas da Ridesa: a alagoana RB 92579, a mineira RB 867515 e as pernambucanas RB 863129 e RB 872552. Em Pernambuco, essas canas mais produtivas já ocupam mais de 60% da área plantada, e em Alagoas, 40%. A variedade RB 92579 é uma das 20 mais plantadas na Região Centro-Sul e, no Nordeste, responde por 30% da área plantada (PMGCA, 2008). A principal característica dessas novas variedades está relacionada à maior tolerância à seca, um problema característico da região Nordeste. Essa modalidade tem mostrado ser capaz de elevar a produtividade por hectare em 20% na região, além de gerar uma cana com um teor de açúcar 30% maior. A RB 92579, tem se destacado, com produtividade até 30% maior (CPTEC/INPE, 2008).

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene do reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Poales, família Poaceae, gênero *Saccharum* e espécie *Saccharum officinarum* L. As raízes são fasciculadas e podem atingir até 4 m de profundidade, embora cerca de 80% das raízes concentrem-se nos 20 cm superficiais do solo. As folhas são simples, alternadas e formadas por lâmina e bainha, ambas ligadas por uma porção internamente membranosa denominada lígula. A bainha, em geral, apresenta

na borda a aurícula e possui pêlos. O caule é um colmo e as flores se arranjam em inflorescência denominada panícula. A cana-de-açúcar é considerada uma das plantas com maior eficiência fotossintética e constitui-se numa cultura de alto rendimento de matéria verde, energia e fibras (Sampaio et al., 1995).

2.2 MICROPROPAGAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR

A multiplicação desta espécie é feita por meio de estacas e algumas variedades não produzem sementes férteis. A adoção de técnicas de propagação *in vitro* (micropropagação) é uma alternativa que possibilita a obtenção de mudas de variedades selecionadas, com alta qualidade fitossanitária em curto período de tempo (Hendre, 1983; Smith & Drew, 1990; Torres et al., 1998; Pereira & Fortes, 2003; Aamir-Ali et al., 2008). A micropropagação massiva é atualmente usada para a multiplicação de novas variedades em muitos países produtores de cana de açúcar (Lakshmanan, 2006). Micropropagação é o termo proposto por Hartmann & Kester (1968), para a multiplicação clonal *in vitro*, devido ao tamanho dos propágulos utilizados.

A cana-de-açúcar foi uma das primeiras culturas industriais a ser micropropagada em escala comercial (World Sugar Statistics, 2005). Os primeiros trabalhos de cultivo *in vitro* com cana-de-açúcar registaram a regeneração de plantas a partir de calos (Nickell, 1964; Barba & Nickell, 1969; Heinz & Mee, 1969). Por meio das técnicas de micropropagação, dez mil mudas de cana-de-açúcar podem ser produzidas em um ano, a partir de uma única planta (Lee, 1987). Sistemas automatizados de imersão temporária surgiram na década de noventa e ampliaram a capacidade de produção de plantas micropropagadas (Lorenzo et al., 1998, 2001; Lakshmanan, 2006). Lal et al (1996) demonstraram que a micropropagação tem um potencial de produção *in vitro* de 75.600 brotos de cana-de-açúcar a partir de um único explante de gema apical no período de 5,5 meses. Um relevante aumento na produção de mudas foi constatado por Anita et al (2000), ao obter mais de 1,5 milhão de plantas a partir de um simples broto apical em seis meses. Observa-se, portanto, que os sistemas *in vitro* para micropropagação desta cultura estão em constante aprimoramento (Bered et al., 1998; Aamir Ali et al., 2008).

2.2.1 ETAPAS DA MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação pode ser dividida em cinco etapas: I –seleção e tratamento fitossanitário da planta matriz com o intuito de minimizar possíveis contaminações na etapa seguinte; II – estabelecimento do cultivo inicial ou primário, abrangendo a seleção, desinfestação e inoculação de explantes em meio nutritivo sob condições assépticas (Erig & Shulg, 2003); III – multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas; IV – enraizamento, que pode ser subdividida em indução, iniciação e alongamento do sistema radicular; V – aclimatização, que consiste na transferência das plantas estabelecidas *in vitro* para o ambiente externo (*ex vitro*) (Krikorian, 1991; Bandeira et al., 2007). As duas primeiras subdivisões da etapa de enraizamento (indução e iniciação) respondem ou dependem de auxina, sendo o crescimento radicular inibido pela presença desse fitormônio (Torres et al., 1998). A fase de aclimatização é considerada crítica, uma vez que essa mudança ambiental implica em estresses fisiológicos que podem resultar em grandes perdas do material micropropagado (Locatelli & Lovato, 2002). A qualidade do sistema radicular é de suma importância para a sobrevivência e desenvolvimento das plantas na etapa *ex vitro* do cultivo.

2.2.2 REGULADORES E CICLOS DE MULTIPLICAÇÃO

Durante os diferentes estágios da micropropagação, os explantes são cultivados em meio nutritivo com diferentes formulações de macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, reguladores de crescimento, entre outros. Essa diversificação de formulações e diluições do meio de cultivo tem o objetivo de atender não só as exigências genóticas, mas também às necessidades metabólicas dos explantes nas diferentes fases de cultivo (Kozay et al., 1997; Pereira & Fortes, 2003). A resposta morfogênica *in vitro* é variável, não apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da mesma espécie (Torres et al., 1998).

As auxinas (ácido indol-3-acético, ácido indol-3-butírico, ácido naftalenoacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, dentre outras) e as citocininas (Benzilaminopurina, cinetina, zeatina dentre outras) são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de calo, parte aérea e raízes são reguladas pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog & Miller, 1957).

As auxinas constituem a classe de hormônios vegetais mais conhecida. O termo é derivado da palavra grega “*auxein*” (aumentar ou crescer) e é utilizado para descrever compostos naturais e sintéticos que apresentam atividade similar ao ácido indol-3-acético (AIA). As auxinas possuem como característica principal a capacidade de induzir alongamento celular (Lemus et al., 2005).

O AIA é sintetizado a partir do aminoácido triptofano em rotas trp dependentes (rota do ácido indol-pirúvico, rota do indol-3-acetaldeído e rota da triptamina). As plantas podem obter AIA também pela β oxidação do ácido 3-indolbutírico (AIB) ou por hidrólise de conjugados nos quais o AIA pode eventualmente estar ligado como aminoácidos, açúcares ou peptídeos (Woodward & Bartel, 2005). De um modo geral, a auxina natural mais abundante é o AIA, entretanto, dependendo da espécie, da idade da planta e das condições sob as quais a planta se desenvolve, outras auxinas naturais podem ser encontradas: ácido 4-cloroindol-3-acético (4-cloroAIA) e ácido fenilacético. Dentre as auxinas sintéticas encontram-se o ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), dentre outras (Kerbaui, 2004).

Após a fase de estabelecimento *in vitro* tem início a indução de morfogênese, via organogênese ou embriogênese somática, e a multiplicação do propágulo obtido, a qual é viabilizada a partir de modificações no balanço auxina/citocinina no meio de cultura, como também pelos componentes orgânicos e inorgânicos. Em geral, sob condições ideais, os explantes regeneram plantas por vários ciclos de multiplicação, porém, em muitas espécies há uma redução na morfogênese ao longo dos subcultivos (Hussey, 1986; Mantel et al., 1994). A determinação da duração da cultura, do número e do intervalo de subcultivos são aspectos essenciais para evitar a regeneração de plantas com alterações genéticas e/ou epigenéticas (Klerk, 1990). As auxinas e/ou citocininas podem interagir também com outros reguladores e com diversas substâncias promotoras de crescimento ativo como tirosina (Skoog & Miller, 1957), fenóis (Lee & Skoog, 1965), ácido ascórbico (Patel & Thorpe, 1988) e até Na_2SO_4 (Pua & Ragolsky, 1985) e promover ou inibir a morfogênese podendo acarretar em perda da capacidade organogênica (Patel & Thorpe, 1988).

Os fitormônios são responsáveis pela atividade integrada das enzimas que, por sua vez, expressam a atividade programada dos genes no tempo e no espaço (Termignoni,

2005). Essa sincronia, porém, só se expressa mediante adequados ajustes na concentração dos fitorreguladores, que são regidos pela etapa da micropropagação a qual a cultura está sendo submetida, gerando resultados favoráveis nas fases posteriores (enraizamento e aclimatização). O enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, sendo a qualidade destas um fator determinante para o sucesso do enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998).

2.2.3 ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

A rizogênese pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes. As duas primeiras etapas respondem ou dependem de auxina, enquanto que o alongamento é inibido na presença desta. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a melhor concentração de auxina é a mínima necessária para proporcionar uma iniciação radicular satisfatória, e que possibilite o maior crescimento e desenvolvimento das raízes sem formação de calo. As auxinas mais utilizadas são o AIB, o ANA e o AIA. Outras, como o 2,4-D, estimulam a formação de calo, não sendo comumente aplicadas na etapa de enraizamento.

Os estudos sobre enraizamento adventício tiveram grande avanço a partir de 1928, com a identificação do primeiro fitormônio de ocorrência natural, uma auxina: ácido 3-indolacético (AIA) (Figura 1). Posteriormente, em 1935, auxinas sintéticas análogas ao AIA, como os ácidos indolbutírico (AIB) (Figura 2) e naftaleno-acético (ANA) (Figura 3) foram preconizados como fitorreguladores de enraizamento (Davis et al., 1988; Hartmann et al., 1990).

Anbalagan et al. (2000) e Nadgouda (2002) afirmam que pode-se obter um adequado enraizamento *in vitro* de cana-de-açúcar utilizando ANA (5mg.L^{-1}) ou a combinação ANA+AIB. Resultados semelhantes com essa combinação foram registrados por Pruski et al. (2005) trabalhando com micropropagação de *Prunus*. Os registros de Zanol et al. (1998) apontam que a concentração de $3,0\ \mu\text{M}$ de AIB, bem como a manutenção dos explantes em escuro aumentam significativamente o enraizamento da cana-de-açúcar, uma vez que a luz geralmente tem um efeito negativo sobre a formação de raízes (Hartmann et al., 1990).

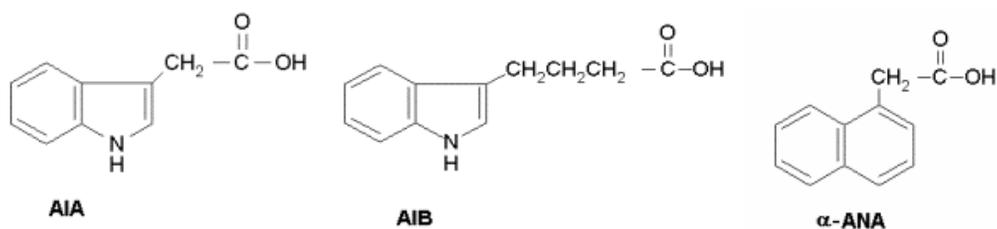


Figura 1. Estrutura química de auxinas: AIA = ácido 3-indolacético; AIB = ácido 3-indolbutírico; ANA = ácido naftalenoacético.

As formulações básicas do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 5mg.L⁻¹ de ANA e 50g.L⁻¹ de sacarose; ou este mesmo meio com metade da força iônica (1/2MS) acrescido de 5mg.L⁻¹ de ANA e 60g.L⁻¹ de sacarose possibilitaram melhor enraizamento, de acordo com os resultados de Cheema et al. (1995) e Singh et al. (2001), respectivamente. Aamir Ali et al. (2008), entretanto, não observaram efeito benéfico da redução de sais do meio de cultivo, obtendo melhor enraizamento das variedades CP 77400 e BL-4 de cana-de-açúcar em meio MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de ANA e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB. Uma alternância de meios mais concentrados na fase de indução e iniciação, e mais diluídos para o alongamento das raízes é uma prática comum no cultivo *in vitro* (Gupta et al., 1983; Drew, 1988) embora as variações sejam inúmeras conforme a espécie.

2.2.4 AUXINAS E COMPOSTOS FENÓLICOS

As auxinas podem ser utilizadas combinadas ou isoladas, com a concentração variando de acordo com a espécie e o genótipo. As auxinas podem também atuar em combinação com cofatores fenólicos, como por exemplo, o ácido cafeico e o floroglucinol (Figuras 3 e 4) (Souza & Pereira, 2007).

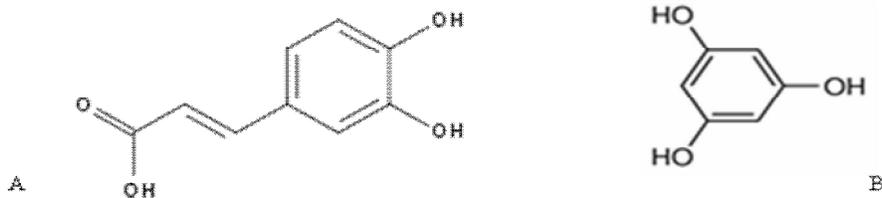


Figura 2. Estrutura química dos compostos fenólicos (A) Ácido cafeico (B) Floroglucinol.

Os compostos fenólicos têm sido avaliados e mencionados como promotores do enraizamento adventício atuando como um conjugado auxina-fenol (Deklerk et al., 1999; Gur et al., 1988; McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Lima, 1998; Assis & Teixeira, 1998). A ação desses compostos fenólicos pode ocorrer mediante estímulo à síntese de auxinas, aumentando sua liberação, como também na proteção das auxinas endógenas servindo como substrato alternativo para a enzima AIA-oxidase (Souza & Pereira, 2007).

A concentração adequada desses indutores de enraizamento, entretanto, é um dos quesitos a ser considerado uma vez pode fazer com que atuem de forma sincrônica promovendo o enraizamento, ou inibindo-o (Batish et al., 2008). O acúmulo de fenólicos, além de outros fatores, pode inibir o processo de enraizamento em decorrência da descarboxilação do AIA (Trobeck et al., 2005) favorecendo a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS - $O_2^{\cdot-}$; H_2O_2 ; OH^{\cdot} ; HO_2^{\cdot}).

2.3 ESTRESSE *IN VITRO* E FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Tradicionalmente o ajuste de protocolos de micropropagação tem ignorado os fatores ambientais do cultivo *in vitro*. Durante as diversas etapas da micropropagação, desde a inoculação até o momento da aclimatização, os explantes e as plantas micropropagadas estão sujeitas a condições ambientais muito diferentes daquelas dos cultivos em casa de vegetação e no campo (Gaspar et al., 2002; Camara & Willadino, 2005). As características peculiares do ambiente *in vitro*, dentre as quais se destacam a natureza e concentração dos gases (etileno, em especial) na atmosfera dos tubos de cultivo, alta umidade relativa, baixa densidade de fluxo de fótons fotossintéticos, alta osmoticidade devido ao alto teor de açúcar no meio, alta disponibilidade de reguladores de crescimento (como auxinas e/ou citocininas) e acumulação de substâncias tóxicas afetam as taxas de crescimento e de desenvolvimento vegetal (Kozai et al., 1997; Franck et al., 2001; Gaspar et al., 2002). Isso se dá frequentemente em decorrência da diminuição nas taxas transpiratória, fotossintética e de absorção de nutrientes, água e CO_2 , o que, em conjunto, pode resultar em redução do crescimento (Kozai et al., 1997). Problemas relativos à qualidade fisiológica de plantas, células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro*, tais como, ausência ou perda da capacidade morfogênica, têm sido examinados (Cassells & Cury, 2001; Gaspar et al., 2002) e acredita-se que podem ser ocasionados por estresse

oxidativo induzido por diversos fatores incluindo a superexposição a reguladores de crescimento *in vitro*.

Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os níveis endógenos de compostos antioxidantes e compostos oxidantes que acarretam o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Cassels & Cury, 2001). A formação de ROS ocorre porque o oxigênio é pouco reativo, mas tem a capacidade de originar estados excitados reativos como radicais livres e derivados (Scandalios, 1993). Com dois átomos de oxigênio, o O_2 é completamente reduzido por quatro elétrons gerando duas moléculas de água. A redução parcial do oxigênio molecular (O_2) leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na forma do radical aniônico superóxido ($O_2^{\cdot-}$), do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila (OH^{\cdot}), quando a redução se dá pela aquisição de um, dois ou três elétrons, respectivamente (Mittler, 2002; Bartoz, 1997).

No primeiro passo da redução de O_2 os radicais formados, superóxidos, têm vida relativamente curta. Esses radicais praticamente não conseguem atravessar membranas biológicas, ficando confinados no compartimento onde foram gerados. Os superóxidos formam hidroxiperóxidos com duplas ligações (enos) ou duplas ligações alternadas (dienos), além de oxidar aminoácidos específicos, como metionina, histidina e triptofano. O superóxido também pode causar peroxidação de lipídeos no ambiente celular e nas membranas celulares (Breusegem et al., 2001). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de não ser um radical livre, atravessa as biomembranas e se distribui a partir do local de sua produção (Breusegem et al., 2001). A última e mais reativa espécie a ser formada pela redução parcial do oxigênio molecular é o radical hidroxila (OH^{\cdot}). Esse radical é formado pela redução do H_2O_2 por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^{2+}) na reação de Fenton e tem grande afinidade por moléculas biológicas em seu sítio de produção. O radical hidroxila apresenta uma meia-vida muito curta, pois reage muito rapidamente com moléculas biológicas, sequestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio (Breusegem et al., 2001; Nordberg & Arner, 2001).

2.4 METABOLISMO ANTIOXIDATIVO

As plantas possuem um complexo sistema antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes (Dewir et al, 2006) capazes de prevenir o acúmulo de ROS e o estresse oxidativo (Saher, et al., 2004; Dewir et al, 2006). As enzimas do sistema antioxidante são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse. Destacam-se entre elas: a catalase (CAT), que converte o H_2O_2 em oxigênio e água; a peroxidase do ascorbato, que atua na oxidação do ascorbato e converte o H_2O_2 em água; e as peroxidases não específicas (POD) que estão envolvidas em ligações de polissacarídeos e lignificação da parede celular, bem como na diminuição do processo peroxidativo dos lipídios de membrana (Libik et al., 2005; Sreenivasulu et al., 1999; Öztürk & Demir, 2002; Pasternak et al., 2002; Öztürk & Demir, 2003).

As polifenoloxidasas (PPO) catalisam a hidroxilação e a degradação oxidativa de compostos fenólicos (Campos et al., 2004). Além do papel estrutural na parede celular, essas enzimas exercem uma função protetora contra a ação das ROS (Ali et al., 2006). A oxidação fenólica é uma resposta característica a ferimentos no tecido vegetal (Borém & Vieira, 2005) e muito comum no cultivo *in vitro*. O teor de fenóis e a medida da atividade das enzimas responsáveis pela oxidação fenólica podem contribuir como indicadores de estresse.

A resposta aos agentes indutores de enraizamento *in vitro* e a existência de um operante sistema de defesa antioxidativo pode assegurar a formação de mudas completas com potencial para o estabelecimento *ex vitro*.

3. REFERÊNCIAS

- ALI, M. B. et al. Phenolic metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. **Plant Science**, v.171, p.147-154, (2006).
- ALI, S. N. A. et al. An Efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Pakistanian Journal Botany**, p. 139-149, (2008).
- ALMEIDA, A. C. dos S. et al. Desenvolvimento vegetativo e produção de variedades de cana-de-açúcar em relação à disponibilidade hídrica e unidades térmicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1441-1448, 2008.
- ANBALAGAN, S., A. KALAMANI & M. SAKILA. *In vitro* propagation of sugarcane: nature of callus, direct regeneration, regeneration through callus and morphological variations. **Research on Crops**, 1(2): 138-140, (2000).
- ANITA, P. et al. Efficient and cost- effective micropropagation of two early maturing varieties of sugarcane (*Saccharum* spp.) **Indian Sugar**, 50: 611–618, (2000).
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, v.1, p.261-96, (1998).
- BANDEIRA, F. S. et al. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v.31, n.5, p.773-781, (2007).
- BARBA, R.; NICKELL, L.G. Nutrition and organ differentiation in tissue culture of sugarcane – a monocotyledon. **Planta**, v.89, p.299-302, (1969).
- BATISH, D. R. et al. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*) **Plant Physiology**, Ed. 165 p. 297-305, (2008).
- BERED, F. et al. Regeneração de plantas de aveia a partir de calos embriogênicos e organogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.1827-1833, (1998).
- BORÉM, A. & VIEIRA, M.L.C. **Glossário de Biotecnologia**. Viçosa, Editora Universidade Federal de Viçosa, p.126, (2005).
- BRAY, EA.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN BB, GRUISSEM W, JONES RL (eds). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville (2000).
- BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, (2001).
- CAMARA, T.R. & WILLADINO, L. Compreendendo o estresse *in vitro*. In: NOGUEIRA, R.J.C.M.; ARAÚJO, E.L.; WILLADINO, L.; CAVALCANTE, U.M. (Ed.). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: MXM Editora, p.325-336, (2005).

CASSELLS, A.C.; CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.145-157, (2001).

CHEEMA, R.K.; GUPTA, J. N. Plants regenerated from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Current Science**, 68(6) p.650-653, (1995).

CPTEC/INPE, 2008. Cana mais produtiva e resistente a seca para o Nordeste brasileiro. Acesso em 03/02/2010. Disponível em: <http://www7.cptec.inpe.br/noticias/faces/impresao.jsp?idConsulta=9339&idQuadros> .

DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, v.2., p. 315 (1988).

DEKLERK G-J, VAN DER KRIEKEN W, DE JONG JC. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In Vitro Cell Development Biol.-Plant** p.189–99, (1999).

DEL RÍO, L.A. et al. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**, v.141, p.330-335, (2006).

DEWIR, Y.H. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, v.58, p.93-99, (2006).

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47- 85, (2002).

ERIG, C.A.; SCHULG, M.W. Estabelecimento *in vitro* de plantas de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivares MC, Adans e Portugal. **Ciência Rural**, v.8, n.2, p.107-115, (2003).

FAO. Acesso em: 2009. Disponível em: <http://apps.fao.org>.

FRANCK, T. et al. Are hyperhydric shoots of *Prunus avium* L. Energy deficient? **Plant Science** 160:1145-1151 (2001).

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Eds.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press,. v.2, p.117-31, (1988).

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

GUR, A.; GAD AE, HAAS E. Rooting of apple rootstock clones as related to phenols and their oxidation. **Acta Horticulturae**. p.160–166, (1988).

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Plant propagation principles and practices**. 2. ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, p.702, (1968).

HENDRE, R.R. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. **Sugarcane**, p.5-8, (1983).

- HEINZ, D.J.; MEE, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science**, v.9, p.46-348, (1969).
- HUSSEY, G. Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. **Plant tissue culture and its agriculture applications**. London, Butterwoths, p. 69-84, (1986).
- KLERK, G.J. How to measure somaclonal variation. **Acta Botanica Neerlandica**. Oxford, V. 38 (2), p. 129-144, (1990).
- KRIKORIAN, A.D Propagación clonal *in vitro*. In: ROCA, W.M. E MROGINSKI. L.A., (Ed.). **Cultivo de tejidos en al agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, CIATp. 95-25, (1991).
- KOZAY, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, p. 49-56, (1997).
- LAL, N & SINGH, H.N.. Rapid clonal multiplication of sugarcane through tissue culture. **Plant Tissue Culture**, Ed.4: p. 1-7, (1996).
- LEE, T.T. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Ed.10 (1), p.47-55, (1987).
- LEE T.T.; Skoog F. Effects of substituted phenols in bud formation and growth of tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, 18:386-402, (1965).
- LIBIK, M.; KONIECZNY, R.; PATER, B.; MISZALSKI, Z. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus culture of the ice plant. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.23, p.834-841, (2005).
- LIMA, C.C.M. **Uso de aditivos e cofatores na rizogênese de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro***. Piracicaba, 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo (1998).
- LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.2, p. 177-184, (2002).
- LORENZO, J.C. et al. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.54, p.197-200, (1998).
- LORENZO, J.C. et al. Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants. **In Vitro Cellular Development Biology Plant**, v.37, p.803-806, (2001).
- LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane – An Addendum to the invited review “‘Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities’ In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41(4):345–363; 2005”. **In Vitro Cellular Development Biology Plant** v.42, p.201–205, (2006).
- MANTEL, S.H. et al. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto, SBG, 344p., (1994).

- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, V. 9, p. 405-410, (2002).
- McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**, Portland: Dioscorides Press., v.2, p.289-302, (1988).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15: p.473-497, (1962).
- NADGAUDA, R.S. Need for tissue culture. Tissue culture pilot plant. **National Chemical Laboratory Pure** p. 1-4, (2002).
- NICKELL, L.G. Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. **Hawaii Plant Research**, v.57, p.223-229, (1964).
- NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, (2001).
- ÖZTÜRK, L.; DEMIR, Y. *In Vivo* and *In Vitro* Protective Role of Proline. **Plant Growth Regulation**, v.38, p.259-264, (2002).
- ÖZTÜRK, L.; DEMIR, Y. Effects of Putrescine and Ethephon on Some Oxidative Stress Enzyme Activities and Proline Content in Salt Stressed Spinach Leaves. **Plant Growth Regulation**, v.40, p.89-95, (2003).
- PASTERNAK, T.P. et al. The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. **Plant Physiology**, v.129, p.1807-1819, (2002).
- PATEL, R.; THORPE, A.T. Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Netherlands 13, p.219-228, (1988).
- PEREIRA, J. E. S., FORTES, G. L. R. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.38, n.9, p.1035-1043 (2003).
- PMGCA – Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (2008). Acessado em 03/02/2010. Disponível em <http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br/htm/catal/censovar.php>.
- PRUSKI, K., T. ASTATKIE & J. NOWAK. Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking cherry (*Prunus tomentosa*). **Plant Cell, Tissue and Organ. Culture**, v.82(2) p.207-211, (2005).
- PUA, E-C.; RAGOLSKY, E; THORPE, T.A. Retention of shoot regeneration capacity of tobacco callus by Na₂SO₄. **Plant Cell Rept** 4:225-228, (1985).
- SAHER, S. et al. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.120, p.152-161, (2004).
- SAMPAIO, E. V. et al. Capacidade de suprimento de nitrogênio e resposta à fertilização de vinte solos de Pernambuco. Campinas, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.19 p.269-279, (1995).

- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, (1993).
- SINGH, B.; YADAV, G. C.; LAL, M. An efficient protocol for micropropagation of sugarcane using shoot tip explants. **Sugar Tech**, v.3 (3). p.113-116, (2001).
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-131, (1957).
- SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, (2007).
- SREENIVASULU, N.et al. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet differential salt tolerance. **Plant Science**, v.141, p.1-9, (1999).
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais** UFRGS, 1ºed (2005).
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUFO, J.A. **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília, Embrapa. v.1, p.183-185, (1998).
- TROBEC, M. et al. Fluctuations of different endogenous phenolic compounds and cinnamic acid in the first days of the rooting process of cherry rootstock 'GiSela 5' leafy cuttings. **Plant Physiology**, p. 589-597, (2005).
- UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo (2008). Acessado em 20 de maio de 2008. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/portalunica/?Secao=referencia>.
- ZANOL, G. C. et al. Uso do ácido indolbutírico e do escuro no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. **Ciência Rural**, v.28, p.387-391, (1998).

4. MANUSCRITO 1

EFEITO DAS AUXINAS NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES DE
CANA-DE AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)¹.

¹Trabalho desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Botânica/UFRPE, enviado para a revista Plant Cell Culture & Micropropagation.

**EFEITO DAS AUXINAS NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES
DE CANA-DE AÇÚCAR (*Saccharum officinarum*).**

**EFFECT OF AUXIN ON *IN VITRO* ROOTING OF VARIETIES OF SUGAR
CANE (*Saccharum officinarum*).**

GILENO VITOR MOTA LIMA¹, GILVANY RODRIGUES DE ANDRADE², LILIA
WILLADINO³, TEREZINHA RANGEL CAMARA⁴.

RESUMO

Este trabalho avaliou o enraizamento *in vitro* das variedades de cana-de-açúcar RB92579 e RB872552 cultivadas em meio MS suplementado com as auxinas AIA (ácido 3-indolacético) e AIB (ácido 3-indolbutírico). Foram estabelecidos os seguintes tratamentos: T₀ - MS sem auxinas; T₁ - 1,5 μmol L⁻¹ de AIA; T₂ - 3,0 μmol L⁻¹ de AIA; T₃ - 1,5 μmol L⁻¹ de AIB; T₄ - 3,0 μmol L⁻¹ de AIB. O maior percentual de enraizamento (78,84%) da variedade RB92579 foi observado em plantas do T₃, enquanto que para a variedade RB872552 o melhor resultado foi obtido no T₁ (82,5%). As variedades apresentaram maior velocidade de iniciação radicular no quinto dia após inoculação, havendo diminuição ao longo do enraizamento *in vitro*. Os tratamentos com AIA favoreceram a formação de folhas e o perfilhamento em ambas as variedades. Na variedade RB872552 o número médio de folhas foi superior aos da RB92579 durante todo o experimento, independente do tratamento auxínico. O perfilhamento foi maior na variedade RB92579 que apresentou 1,38, 1,60 e 1,87 perfilhos/planta aos 10, 15 e 20 dias, respectivamente, enquanto que a variedade RB 872552 apresentou 0,96, 1,15 e 1,32 perfilhos/planta, no mesmo período. O perfilhamento aumentou com o tempo de tratamento independente da concentração e do tipo de auxina utilizado.

Termos para indexação: micropropagação, reguladores de crescimento, rizogênese

ABSTRACT

This study evaluated the *in vitro* rooting of varieties of sugar cane RB92579-RB872552 and grown on MS medium supplemented with the auxin IAA (3-acetic acid) and IBA (indole-3-butyric acid). Established the following treatments: T0 - MS without auxin; T1 - 1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ IAA, T2 - 3.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ IAA, T3 - 1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ IBA, T4 - 3.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ IBA. The highest percentage of rooting (78.84%) of variety RB92579 was observed in plants of the T3, while for variety RB872552 the best result was obtained in T1 (82.5%). The varieties showed a higher rate of root initiation on the fifth day after inoculation, along with decrease of rooting. Treatments with IAA favored the formation of leaves and tillers in both varieties. The variety RB872552 the average number of leaves was higher than that of RB92579 throughout the experiment, regardless of the auxin treatment. Tillering was greater in variety RB92579 showed that 1.38, 1.60 and 1.87 tillers / plant at 10, 15 and 20 days respectively, while the variety RB 872552 had 0.96, 1.15 and 1, 32 tillers / plant in the same period. Tillering increased with time of treatment independent of the concentration and type of auxin used.

Index Terms: micropropagation, growth regulators, rhizogenesis.

INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma área de mais de quatro milhões de hectares com cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e consolidou-se como o maior produtor e exportador de cana-de-açúcar e etanol do mundo, além de ter sido o primeiro país a implantar, em larga escala, um biocombustível renovável alternativo ao petróleo (Unica, 2008). Os primeiros trabalhos de cultivo *in vitro* com cana-de-açúcar registraram a regeneração de plantas a partir de calos, nos idos da década de sessenta do século passado (Nickell, 1964; Barba & Nickell, 1969; Heinz & Mee, 1969). Uma das primeiras culturas industriais a ser micropropagada em escala comercial (World Sugar Statistics, 2005), a micropropagação massiva da cana-de-açúcar é usada atualmente para multiplicar novas variedades em muitos países produtores. A partir do lançamento de novas variedades, a disponibilização em grande escala do material melhorado é uma etapa crucial para a implantação de

cultivos com os genótipos elite. A adoção de diversas metodologias de cultivo para clonagem e propagação massiva de material selecionado pode assegurar a qualidade genética e fitossanitária da cana-semente micropropagada (Hendre, 1983; Khan et al., 2008; Ali et al., 2008).

O estabelecimento de um protocolo de micropropagação tem o enraizamento *in vitro* como um dos fatores limitantes. O desenvolvimento de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condição *in vitro* ou *in vivo* é um processo de grande complexidade que envolve fatores endógenos e exógenos ainda não completamente elucidados (Souza & Pereira, 2007). As raízes adventícias de plantas cultivadas *in vitro* podem ser formadas, na fase de multiplicação, a partir de células de parênquima localizadas na parte aérea e a rizogênese pode ocorrer de modo direto ou indireto, passando pela formação de calos (Grattapaglia & Machado, 1998).

A identificação do primeiro fitormônio de ocorrência natural, o ácido 3-indolacético (AIA), uma auxina, estimulou os estudos sobre enraizamento adventício a partir de 1928 quando foram alcançados grandes avanços. A atividade indutora de raízes dessa auxina foi relatada inicialmente por Thimann & Skoog (1934). Posteriormente, auxinas sintéticas como os ácidos indolbutírico (AIB) e α -naftalenoacético (ANA), análogas ao AIA, foram preconizadas como fitorreguladores de enraizamento (Zimmerman & Wilcoxon, 1935). As auxinas exercem importante função no crescimento e desenvolvimento da parte aérea e radicular do vegetal, e a concentração endógena e exógena delas, isoladas ou combinadas com citocininas, é um fator crítico para o êxito das várias etapas de micropropagação (Woodward & Bartel, 2005).

As auxinas agem, inicialmente, em células do meristema primário e secundário, estimulando a divisão e o subsequente alongamento celular. Essa ação inicial culmina com a formação das raízes. Ao longo do processo de enraizamento adventício (indução,

iniciação e alongamento) a atividade enzimática acarreta oscilações na concentração de auxina endógena, tornando necessária, muitas vezes, a suplementação exógena (Ford et al., 2001). Um alto nível de auxinas endógenas pode ser necessário para a iniciação de raízes adventícias. Existe uma relação intrínseca entre os níveis endógenos e a habilidade para iniciar raízes. Em geral, após aplicação de uma auxina sintética, ocorre um aumento imediato da concentração endógena de auxina natural e, conseqüentemente, há o início da formação de raízes (Gaspar & Hofinger, 1988). As etapas de indução e iniciação da rizogênese dependem de auxina, mas a fase de alongamento radicular é inibido na presença desse regulador.

Um dos fatores que condicionam à eficiência do enraizamento de plantas *in vitro* é o genótipo (Grattapaglia & Machado, 1998). Estudos genéticos e moleculares recentes têm mostrado que a formação de raízes adventícias é um caráter quantitativo herdável controlado por vários fatores (Sorin et al. 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de variedades de cana-de-açúcar (RB 92579 e RB 872552) à indução do enraizamento *in vitro* por meio da adição de auxinas (AIA, AIB) ao meio de cultura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de realização das atividades

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus de Dois Irmãos, em Recife.

Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas plantas das variedades RB 92579 e RB 872552 com altura média de 4,0 cm. Esses genótipos destacam-se pela alta produtividade, elevado teor de sacarose, por não possuir restrições quanto ao ambiente de produção, por apresentarem baixa

exigência nutricional, sendo recomendados o plantio no verão (Ridesa, 2005). Essas variedades, juntamente com a RB 867515 e a RB 863129, estão entre as quatro mais plantadas na região Nordeste e respondem por 60% da área cultivada com cana-de-açúcar em Pernambuco (CPTEC/INPE, 2008).

Para instalação do experimento o material vegetal (cultivares RB 92579 e RB 872552) foi cedido pela Biofábrica Governador Miguel Arraes – CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste).

Foi utilizado o meio basal MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), inositol ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) e ágar ($6,5 \text{ g L}^{-1}$). O meio foi esterilizado pela adição de CaOCl ($0,1\% \text{ p/v}$) e o pH foi ajustado em 5,8. Os tratamentos consistiram da adição de auxinas (AIB ou AIA) nas concentrações de 1,5 e $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, além de um tratamento controle sem adição de reguladores de crescimento: T_0 – (MS sem auxina); T_1 – $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AIA; T_2 – $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AIA; T_3 – $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AIB; T_4 – $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AIB. As plantas foram transferidas para frascos de vidro contendo 30 mL de meio nutritivo dos respectivos tratamentos e foram incubadas em sala de crescimento a temperatura de $29 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um esquema fatorial 5×2 (5 tratamentos \times 2 variedades), com 20 repetições por tratamento. Cada repetição contou com quatro explantes por frasco, totalizando 80 explantes por tratamento. Foram realizadas quatro avaliações ao longo do experimento, que teve duração de 80 dias. Avaliou-se o percentual de enraizamento, o número de folhas e de perfilhos, e o índice de velocidade de iniciação de enraizamento (IVE - adaptado da metodologia proposta por Popinigis (1977)). O IVE foi calculado pela fórmula:

$$\text{IVE} = (E_1/T_1 + E_2/T_2 + \dots + E_n/T_n)$$

Onde:

IVE = índice de velocidade de iniciação de enraizamento;

E = número de plantas enraizadas a cada dia;

T = tempo (dias) decorrido desde a inoculação.

Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT (Assis & Silva, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de auxina ao meio de cultura promoveu o enraizamento das mudas de ambas as variedades estudadas (Tabela 1; Figura 1). A variedade RB 872552 apresentou maior percentual de enraizamento (82,5%) quando cultivada em meio MS com a concentração de 1,5 μM de AIA e foi superior à variedade RB 92579 em todos os tratamentos, exceto naquele em que se adicionou 3,0 μM de AIB. Nesse tratamento a variedade RB 92579 apresentou seu maior percentual de enraizamento (78,84%).

Tabela 1. Percentual de enraizamento das variedades de cana-de-açúcar RB 92579 e RB 872552 após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com distintas concentrações de AIA ou AIB.

Tratamento	Variedade	
	RB 92579	RB 872552
	%	
Controle	39,28 bE	48,43 aE
1,5 μM AIA	52,27 bD	82,50 aA
3,0 μM AIA	60,00 bB	78,75 aB
1,5 μM AIB	52,77 bC	64,58 aD
3,0 μM AIB	78,84 aA	68,75 BC

*Valores percentuais seguidos pela mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade.

Roy & Kabir (2007), trabalhando com micropropagação de cana-de-açúcar (var. Isd 32) obtiveram 90 % de brotos enraizados aos 15 dias de cultivo, utilizando $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, já Pathak et al (2009), estudando o efeito de reguladores de crescimento na multiplicação e enraizamento *in vitro* das variedades de cana-de-açúcar CoS 99259 e Cose 01235 obtiveram, respectivamente, 93 % e 95 % de enraizamento utilizando 5 mg L^{-1} de ANA. Ramanand et al. (2007) registraram percentuais de enraizamento similares utilizando a mesma concentração de ANA para outras variedades (Cos 96268 e Cos 95255). Quando cultivada com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB a variedade de cana-de-açúcar CPF-237 apresentou 80% de enraizamento e quando empregou-se $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA não passou de 30% (Khan et al., 2008). Dessa forma, observam-se diferenças no potencial de enraizamento condicionadas pelos genótipos de uma mesma espécie, em função tanto da auxina como da dose utilizada (Souza & Pereira, 2007).

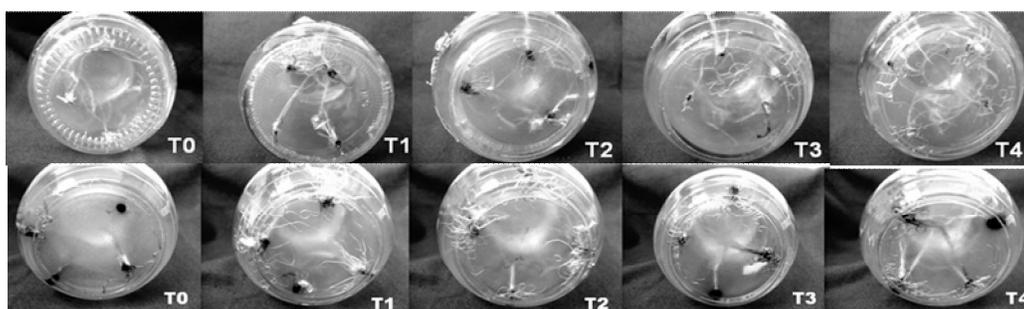


Figura 1 – Desenvolvimento radicular das variedades RB 92579 (a - e) e RB-872552 (f - j) durante o cultivo *in vitro* em meio MS com distintas concentrações de AIA e AIB (0, 1,5 e 3,0 μM), aos 20 dias de cultivo.

As variedades RB 92579 e RB 872552 apresentaram maior índice de velocidade de iniciação de enraizamento (IVE) no quinto dia após a inoculação, havendo uma diminuição gradativa ao longo do processo de enraizamento *in vitro*. A resposta da variedade RB 92579 foi mais rápida e persistiu ao longo do período experimental, superando a variedade RB 872552 (Figura 2).

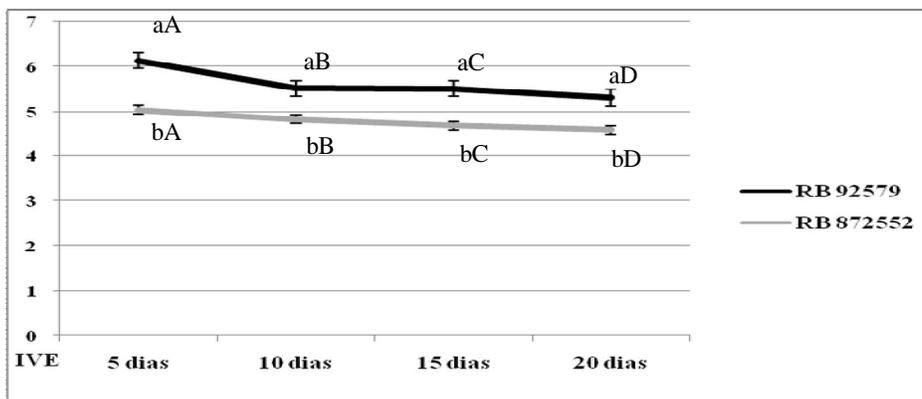


Figura 2. Índice de velocidade de iniciação de enraizamento (IVE) *in vitro* (interação Genótipos x Tempo de tratamento) de duas variedades de cana-de-açúcar cultivadas em meio MS acrescido com distintas concentrações de AIA ou ANA (0, 1,5 e 3,0 μM). Letras iguais, maiúsculas dentro de cada variedade e minúsculas dentro de cada período, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Gaspar & Hofinger (1988), após a aplicação de uma auxina exógena, geralmente no período de 72 a 120 horas, ocorre um aumento no nível endógeno de auxina endógena e, conseqüentemente, há o início da formação da maioria das raízes primárias. De acordo com alguns autores, após esse tempo as auxinas não são mais necessárias, sendo inibitórias para a formação do meristema radicular (De Klerk et al., 1999). A mesma tendência foi observada nas plantas cultivadas em meio sem auxina, embora com um IVE inferior ao das plantas dos demais tratamentos.

Os resultados para o IVE coincidiram com os de percentual de enraizamento, no que diz respeito à interação 'genótipo x auxinas'. Evidenciou-se que a indução e iniciação de raízes na variedade RB 92579 foram melhores no tratamento com 3,0 μM de AIB (T_4), enquanto que na variedade RB 872552 o melhor resultado registrou-se no meio com 1,5 μM de AIA (Tabela 2).

Tabela 2. Índice de velocidade de iniciação de enraizamento (IVE) *in vitro* (Interação Genótipos x Auxinas) de duas variedades de cana-de-açúcar cultivadas em meio MS acrescido com distintas concentrações de AIA ou AIB (0, 1,5 e 3,0 μM)

Genótipos	Controle	Tratamentos			
		1,5 μM AIA	3,0 μM AIA	1,5 μM AIB	3,0 μM AIB
RB 92579	3,96 Ea	4,12 Db	6,82 Ba	4,95 Ca	8,25 Aa
RB 872552	2,68 Eb	8,55 Aa	5,87 Bb	3,91 Cb	2,90 Db

Letras maiúsculas comparam linhas e as letras minúsculas comparam colunas *Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada variedade, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No que se refere ao número de folhas, a variedade RB 872552 apresentou um número de folhas superior ao da variedade RB 92579 ao longo de todo o experimento, independente do tratamento auxínico aplicado (Tabela 3). Observou-se interação significativa para os fatores ‘genótipo x tratamento’ apenas nas avaliações feitas aos 15 e 20 dias de tratamento. Os resultados do teste de comparação de médias para esses dois períodos de avaliação demonstram que não houve efeito dos tratamentos sobre o número de folhas nas plantas da variedade RB 92579. Na variedade RB 872552, entretanto, o número de folhas foi superior nos tratamentos contendo 1,5 e 3,0 μM de AIA, com 5,55 e 5,1 folhas/planta, respectivamente (Tabela 3). Esses valores são muito próximos daqueles obtidos por Khan et al. (2008), 5,66 folhas, na micropropagação das variedades de cana-de-açúcar CP-77-400 e CPF-237, em meio acrescido de cinetina e giberelina (1,0 mg L^{-1} Kin + 0,1 mg L^{-1} GA₃). O uso de baixas concentrações de reguladores de crescimento para um mesmo resultado é sempre um aspecto positivo dado ao alto custo e ao favorecimento de ocorrência de variação somaclonal em tecido vegetal tratado com doses altas ou períodos prolongados com esses reagentes.

Tabela 3. Número de folhas das variedades de cana-de-açúcar RB 92579 e RB 872552 aos 10, 15 e 20 dias de cultivo em meio MS com distintas concentrações de AIA ou AIB.

Tratamentos	RB92579	RB872552	RB 92579	RB872552	RB 92579	RB 872552
	10 dias		15 dias		20 dias	
Controle	3,4 b	3,7 a	3,85 Ab	4,2 Ba	4,15Ab	4,5 BCa
1,5µM AIA	3,4 b	4,15 a	3,85 Ab	5,05 Aa	4,1Ab	5,55 Aa
3,0µM AIA	3,65 b	4,4 a	3,6 Ab	4,8 Aa	4,2 Ab	5,1 ABa
1,5µM AIB	3,25 b	3,75 a	3,6 Ab	4,1 BCa	3,8Ab	4,2 Ca
3,0µM AIB	3,6 b	3,9 a	3,85 Ab	4,45 Ba	4,3Aa	4,6 BCa

Letras iguais para cada período de avaliação, maiúsculas entre linhas e minúsculas entre colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Aos 10 dias a interação Genótipo \times Tratamento não foi significativa.

A análise estatística do número de perfilhos em função do tempo apresentou efeito significativo dos tratamentos com auxinas e dos genótipos. A interação desses dois fatores só foi significativa para a avaliação feita aos 15 dias de tratamento. A variedade RB 92579 perfilhou mais do que a variedade RB872552, ao longo de todo o período experimental. A variedade RB 92579 apresentou, em média, 1,38; 1,60; 1,87 perfilhos/planta aos 10, 15 e 20 dias, respectivamente, enquanto que na variedade RB 872552 o número médio de perfilhos/planta foi respectivamente 0,96; 1,15; 1,32. (Figura 3). Khan et al. (2008), trabalhando com a micropropagação de três genótipos de cana-de-açúcar registraram a formação de 3,5 perfilhos/planta, contudo, a melhor média de perfilhamento (5,83 perfilhos/planta) foi obtida para o tratamento contendo 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ GA₃. Roy & Kabir (2007), trabalhando com a micropropagação da variedade Isd 32 obtiveram cerca de 17 perfilhos/planta com a concentração de 1,5 mg L⁻¹ de BA + 0,5 mg L⁻¹ de ANA. Reconhecidamente as citocininas são utilizadas na indução de brotações na fase de multiplicação dos protocolos de micropropagação *in vitro*.

O mais expressivo perfilhamento observado na variedade RB92579 contrasta com o enraizamento inferior dessa variedade em comparação com a RB 872552. Nota-se, entretanto, que precisamente no tratamento em que a RB 92579 exibiu o maior percentual de enraizamento (tratamento com 3,0 µM de AIB) ocorreu o menor perfilhamento.

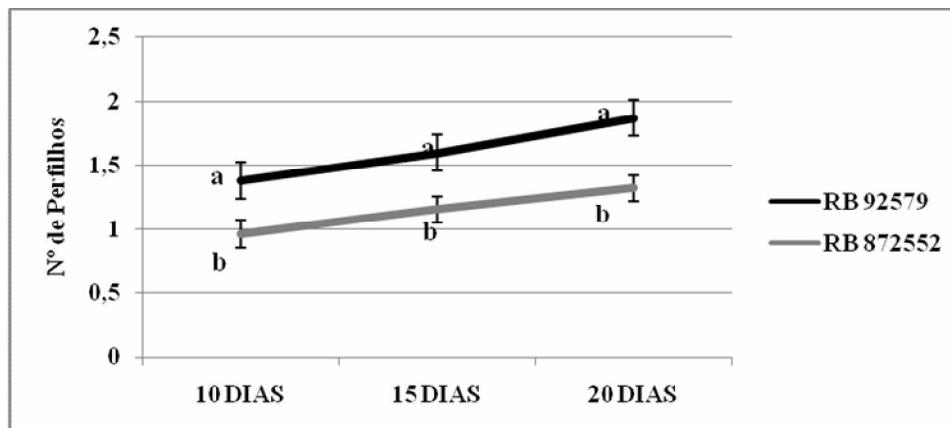


Figura 3. Número de perfilhos das variedades de cana-de-açúcar RB 92579 e RB872552 aos 10, 15 e 20 dias de cultivo em meio de enraizamento MS com distintas concentrações de AIA e AIB (0, 1,5 e 3,0 μ M). Letras diferentes entre variedades, a cada época de avaliação, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os tratamentos com AIA promoveram maior perfilhamento ao longo de todo o período de avaliação. O perfilhamento aumentou com o tempo de tratamento independente da concentração e do tipo de auxina utilizado (Figura 3). Esse aumento na formação de perfilhos coincidiu com a diminuição na velocidade de emissão de raízes (Figura 1 - IVE). Embora seja reconhecida a exigência de uma concentração mínima de auxinas para a emissão de raízes, o crescimento radicular é fortemente inibido por concentrações de auxinas que induzem a alongação da parte aérea (caules e coleptilos) (Taiz & Zieger, 2004).

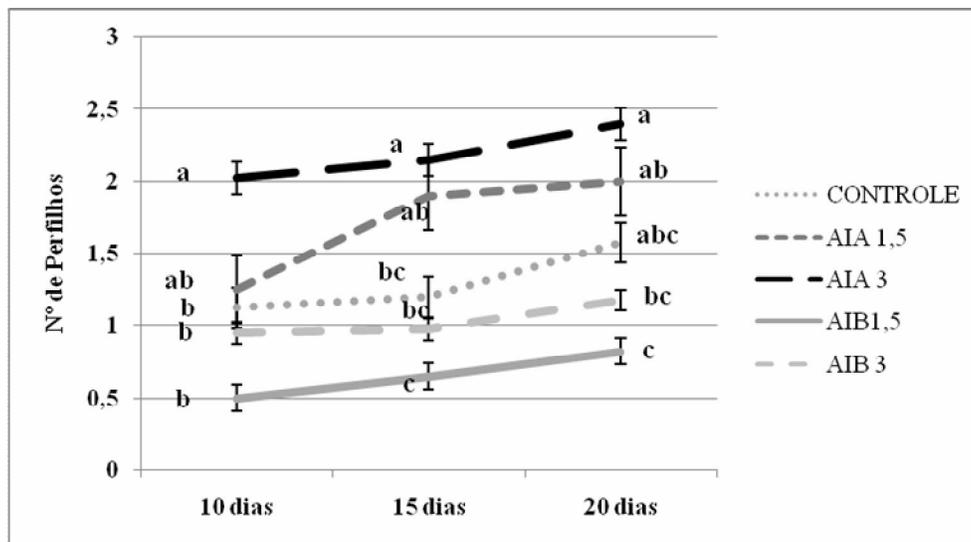


Figura 4. Número de perfíhos das variedades de cana-de-açúcar RB 92579 e RB872552 aos 10, 15 e 20 dias de cultivo em função da concentração de AIA e AIB (0, 1,5 e 3,0 μM) em meio de enraizamento MS. Letras diferentes entre tratamentos, a cada época de avaliação, indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

Os resultados confirmam a diferença genotípica na resposta aos indutores auxínicos. A variedade RB 92579 de cana-de-açúcar é menos responsiva e depende de concentrações mais altas de auxina no meio MS.

O tratamento com 3,0 μM de AIB é o mais recomendado para indução de enraizamento da variedade RB 92579, enquanto que a concentração de 1,5 μM de AIA é mais adequada para variedade RB 872552.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de mestrado. Ao CETENE pela cessão de mudas das variedades de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S. N. A.; SIDDIQUI, F. A., IQBAL, J. An Efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Pakistanian Journal Botany**. p. 139-149, 2008.

ASSIS, E SILVA. F. **Assistat**. Versão 7.3 beta. 2006.

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

DEKLERK G-J; VAN DER KRIEKEN W, DE JONG JC. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In Vitro Cell Development Biology Plant**, 189–99, 1999.

FORD, Y.Y. et al. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, v.10, p.1-11, 2001.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Eds.). Adventitious root formation in cuttings. **Portland: Dioscorides Press**. v.2, p.117-31, 1988.

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

HEINZ, D.J.; MEE, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science** v.9, p.46-348, 1969.

HENDRE, R.R. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. **Sugarcane**. p.5-8, 1983.

- KHAN, S.A. et al. Rapid micropropagation of three elite Sugarcane(*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 7, p. 2174-2180, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962, A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.
- NICKELL, L.G. Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. **Hawaii Plant Research**, v.57, p.223-229, 1964.
- PATHAK, S. et al. Effect of growth regulators on in vitro multiplication and rooting of shoot cultures in sugarcane. **Sugartech**, v.1, p.86-88, 2009.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289p.
- RAMANAND, M.; LAL, S.B.; SINGH, V.P. Optimization of rooting in micropropagated shoots of sugar cane **Sugartech**, v.9, p.95-97, 2007.
- RIDESA - Rede Inter-universitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Boletim Técnico de Lançamento de novas variedades RB de Cana-de-Açúcar. (Eds: Simões-Neto, D.E.; Melo, L.J.O.; Chaves, A.; Lima, R.O.R.). Recife, Imprensa Universitária da UFRPE, Recife,. (Boletim Técnico Nº 1), 2005, 28p.
- ROY, P.K; KABIR, M.H. *In vitro* mass propagation of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) var. Isd 32 trough shoots tips and folded leaves culture. **Biotechnology**, v. 6, p. 588-592, 2007.
- SORIN, C. et al. Proteomic analysis of different mutant genotypes of *Arabidopsis* led to the identification of 11 proteins correlating with adventitious root development. **Plant Physiology**, 140, p.349-364 2006.
- SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.
- TAIZ, L; ZEIGER. E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Ed. Artmed, 2004.

THIMANN, K.V; SKOOG, F. On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in *Vicia faba* Proceedings of the Royal Society of London Series B. **Biological Science**, London, v. 144, p. 317-339, 1934.

UNICA/União da Agroindústria Canavieira de São Paulo (2008). Acessado em 20 de maio de 2008. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/portalunica/?Secao=referencia>.

WOODWARD, A.W; BARTEL, B. Auxin: Regulation, Action and Interaction. **Annals of Botany**. v. 95, p. 707-735, 2005.

WORLD SUGAR STATISTICS. Kent, UK: F.O. **Lichts & Agra Information Limited**, 2005.

ZIMMERMAN, W.; WILCOXON, F. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. **Contrib. Boyce Thompson Inst.** v.7, 209-217, 1935.

5. MANUSCRITO 2

INTERAÇÕES ENTRE AUXINAS E COFADORES FENÓLICOS NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DA VARIEDADE RB 92579 DE CANA-DE- AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)¹

¹Trabalho desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Botânica a ser enviado para a revista Scientia Agrícola.

INTERACTIONS BETWEEN AUXINS AND PHENOLIC COFACTORS ON IN
VITRO ROOTING OF RB 92579 VARIETY OF SUGARCANE (*Saccharum
officinarum* L.)

GILENO VITOR MOTA LIMA^{1*}; LILIA WILLADINO²; CLÁUDIA ULISSES³; TEREZINHA RANGEL CAMARA⁴.

¹Mestrando em Botânica – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE – Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – CEP 52171-900 – Recife, PE – *vitorbio27@gmail.com

²Professora do Departamento de Biologia – Área de Botânica – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE – Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – CEP 52171-900 – Recife, PE .

³Professora do Departamento de Biologia – Área de Botânica – Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE.

⁴Professora do Departamento de Química – Área Química Agrícola – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE – Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – CEP 52171-900 – Recife, PE .

ABSTRACT: This study evaluated the effect of number of subcultures (6 and 12) and the action of auxin relating or no to phenolic cofactors in the induction of *in vitro* rooting of the variety RB 92579, correlating with the activity of antioxidant defense system. Two experiments were conducted. The first evaluated the combination of the number of subcultures and the presence of the auxins IBA and IAA (3µM), totaling six treatments. In the second experiment, MS medium was supplemented with the auxins IBA and IAA (3µM) isolated or associated with different concentrations of caffeic acid and phloroglucinol (1.5 and 3.0 µM). It also held a control without addition of auxin or phenolic, totaling 11 treatments. The number of subcultures caused a reduction in emission at tillering and root, but did not impair the formation of new leaves. Plants with IBA + phloroglucinol were higher as the percentage of rooting, root length. The concentration of 3.0 µM of phenol + IBA, increased the content of phenols is inversely proportional to the activity of peroxidase and polyphenoloxidase. The addition of IAA produced the fastest root issue and more leaves. IBA + caffeic acid provided the highest fresh root biomass and higher while the concentration of 3.0 mM of caffeic acid + IBA showed higher fresh weight of shoots and more shoots rooted or not. Treatment IAA + caffeic acid or phloroglucinol (3.0 µM) gave satisfactory results regarding the length of the shoot with no significant difference. There was high activity of peroxidase and polyphenol oxidase in the roots in all treatments except the control (peroxidase) and the treatment containing phloroglucinol (3.0 µM) (polifenoloxidase). The phloroglucinol + auxin showed higher catalase activity in the shoot while the caffeic acid + auxin showed na increase in the root.

Keywords: caffeic acid, phloroglucinol, antioxidative enzymes, number of subcultures.

INTERAÇÕES ENTRE AUXINAS E COFADORES FENÓLICOS NO
ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DA VARIEDADE RB 92579 DE CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

RESUMO: Este trabalho avaliou o efeito do número de subcultivos (6 e 12) e a ação de auxinas associadas ou não à cofatores fenólicos na indução de enraizamento *in vitro* da variedade RB 92579, correlacionando com a atividade do sistema de defesa antioxidativo. Foram realizados dois experimentos. No primeiro avaliou-se a combinação entre o número de subcultivos e a presença das auxinas AIB e AIA (3 μ M), totalizando seis tratamentos. No segundo experimento, o meio MS foi suplementado com as auxinas AIB e AIA (3 μ M) isoladas ou associadas a distintas concentrações de ácido cafeico e floroglucinol (1,5 e 3,0 μ M). Foi mantido também um tratamento controle, sem adição de auxinas nem fenólicos, totalizando 11 tratamentos. O número de subcultivos acarretou redução na emissão radicular e no perfilhamento, todavia não prejudicou a formação de novas folhas. As plantas com AIB+floroglucinol foram superiores quanto ao percentual de enraizamento, comprimento radicular. A concentração de 3,0 μ M+AIB deste fenol, proporcionou maior teor de fenóis sendo inversamente proporcional à atividade da peroxidase e polifenoloxidase. A adição de AIA proporcionou maior velocidade de emissão radicular e maior número de folhas. O AIB+ácido cafeico proporcionou maior biomassa fresca radicular sendo superior, enquanto que a concentração de 3,0 μ M de ácido cafeico+AIB proporcionou maior biomassa fresca da parte aérea e maior número de perfilhos enraizados ou não. O tratamento AIA+ácido cafeico ou floroglucinol (3,0 μ M) proporcionou resultados satisfatórios quanto ao comprimento da parte aérea não havendo diferença significativa. Verificou-se elevada atividade da peroxidase e polifenoloxidase na parte radicular em todos os tratamentos exceto o controle (peroxidase) e o tratamento contendo floroglucinol (3,0 μ M) (polifenoloxidase). O floroglucinol+auxinas proporcionou maior atividade da catalase na parte aérea enquanto que o ácido cafeico+auxinas apresentou aumento significativo na parte radicular.

Palavras-chave: ácido cafeico, enzimas antioxidativas, floroglucinol, número de subcultivos.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de açúcar e álcool (etanol) oriundos da cana-de-açúcar (World Sugar Statistics, 2005). A micropropagação da cana-de-açúcar, uma das primeiras culturas industriais a ser propagada *in vitro* em escala comercial, é atualmente utilizada para a multiplicação de novas variedades. A micropropagação viabiliza a obtenção de mudas com alto padrão fitossanitário e em reduzido espaço de tempo (Torres et al., 1998; Pereira & Fortes 2003; Aamir Ali et al., 2008). Todavia, se não observados os limites produtivos quanto ao número de subcultivos e tempo de cultivo

in vitro, podem ocorrer alterações na capacidade de regeneração das plantas, devido à perda da capacidade organogênica (Hussey, 1986; Mantel et al., 1994).

A indução e o desenvolvimento do sistema radicular durante o cultivo *in vitro* é um dos obstáculos na micropropagação (Souza & Pereira, 2007). Ao longo do enraizamento adventício a concentração de auxina endógena sofre oscilações, reflexo da atividade enzimática, sendo necessária suplementação com auxinas sintéticas (Gaspar & Hofinger, 1988). Além das auxinas, outras substâncias agem como cofatores para o enraizamento como os compostos fenólicos, entre eles o ácido cafeico e o floroglucinol (Grattapaglia & Machado, 1998; Deklerk et al., 1999). O acúmulo desses compostos fenólicos, entretanto, pode inibir o enraizamento (Trobeck et al., 2005) favorecendo a ocorrência de estresse oxidativo pela formação excessiva de espécies reativas de oxigênio, que podem acarretar danos celulares, embora tenham função sinalizadoras em processos de crescimento e desenvolvimento celular quando em baixas concentrações (Del Río et al., 2006). As plantas dispõem de um complexo sistema antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes capaz de prevenir o acúmulo de ROS e o estresse oxidativo extremo (Saher, et al., 2004; Dewir et al, 2006), e evitar a perda da capacidade morfogênica *in vitro*.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do número de subcultivos e a ação de auxinas associadas ou não à cofatores fenólicos na indução de enraizamento *in vitro* da variedade RB 92579, correlacionando com a atividade do sistema de defesa antioxidativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização das atividades

A condução dos experimentos e as análises enzimáticas e bioquímicas foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife.

Material Vegetal e Cultivo *in vitro*

O experimento foi conduzido com a variedade de cana-de-açúcar RB 92579, desenvolvida no Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar/PMGCA na EECAC/UFRPE. Essa variedade RB 92579 destaca-se pela alta produtividade e elevado teor de sacarose e por não possuir restrições quanto ao ambiente de produção. O material vegetal foi cedido pela Biofábrica Governador Miguel Arraes do CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste). Essa variedade, juntamente com a RB 872552, RB 867515 e a RB 863129, estão entre as quatro mais plantadas na região Nordeste e respondem por 60% da área cultivada com cana-de-açúcar em Pernambuco (CPTEC/INPE, 2008).

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFRPE. Utilizaram-se plantas micropropagadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) que apresentavam em média 4,0 cm de altura e 0,0607 g de matéria fresca.

Condições de cultivo e meio de cultura

O meio básico foi constituído pelos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementados com sacarose (30 g L⁻¹), inositol (0,5g L⁻¹) e ágar (7g L⁻¹). O meio foi esterilizado pela adição de hipoclorito de cálcio (CaOCl 0,1% p/v) e o pH foi ajustado em 5,8. Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, as culturas foram mantidas em sala de crescimento a temperatura de 29 ±2°C e fotoperíodo de 16 horas durante 30 dias.

1º Experimento: Influência do número de subcultivos no enraizamento *in vitro* do genótipo RB 92579.

Este experimento constou de um fatorial 3x2, definido pelos tratamentos com ou sem auxina (controle - sem auxina; 3 µM AIA; 3 µM AIB) e o número de subcultivos (6 e 12). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 40 repetições. A unidade experimental contou com quatro plantas por frasco, totalizando 160 explantes por tratamento. As variáveis avaliadas aos 30 dias foram: percentual de enraizamento, número de folhas e número de perfilhos.

2º Experimento: Interações entre auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento *in vitro* de variedade de cana-de-açúcar.

Este experimento consistiu em um esquema fatorial diferenciado de (2x5) + 1, constituído por duas fontes de auxinas (AIA ou AIB, na concentração de 3µM,) e cinco combinações de concentrações de cofatores fenólicos (sem cofatores fenólicos; 1,5 µM ácido cafeico, 3,0 µM ácido cafeico, 1,5 µM floroglucinol e 3,0 µM floroglucinol) além da testemunha absoluta, sem auxinas e sem fenóis, totalizando 11 tratamentos.

Nas diferentes etapas do enraizamento (indução e iniciação) adicionaram-se ao meio básico as auxinas AIB ou AIA, combinadas ou não com o ácido cafeico ou o floroglucinol nas concentrações de 1,5 µM e 3 µM.

Para análise estatística da atividade enzimática e do teor de fenóis utilizou-se um esquema fatorial triplo (2x5x2) constituído pelos três fatores [fontes de auxinas (AIA ou AIB) x concentrações de cofatores fenólicos (ácido cafeico ou floroglucinol)] x partes da planta (parte aérea ou raiz) além da testemunha.

Indução e Iniciação do enraizamento *in vitro*

Cinco dias após a transferência das plantas dos biorreatores para o sistema de cultivo em frascos de micropropagação convencional no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/UFRPE, o material vegetal foi subcultivado para meio de cultura MS com os respectivos tratamentos: T0 (MS sem auxina = testemunha); T1 (3,0 µM de AIA); T2 (3,0 µM de AIA + 1,5 µM de ácido cafeico); T3 (3,0 µM de AIA + 3,0 µM de ácido cafeico); T4 (3,0 µM de AIA + 1,5 µM de floroglucinol); T5 (3,0 µM de AIA + 3,0 µM de floroglucinol); T6 (3,0 µM de AIB); T7 (3,0 µM de AIB + 1,5 µM de ácido cafeico); T8 (3,0 µM de AIB + 3,0 µM de ácido cafeico); T9 (3,0 µM de AIB + 1,5 µM de floroglucinol); T10 (3,0 µM de AIB + 3,0 µM de floroglucinol).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 40 repetições. A unidade experimental contou com quatro plantas por frasco, totalizando 160 explantes por tratamento. Os parâmetros avaliados aos 30 dias desta etapa (indução) foram: percentual de enraizamento, comprimento e peso fresco da parte aérea e das raízes, número de folhas, número de perfilhos (enraizados ou não) e o índice de velocidade de iniciação de enraizamento (IVE), adaptado da fórmula proposta por Popinigis (1977) para IVG (índice de velocidade de germinação):

$$IVE = (E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n)$$

Onde:

IVE = índice de velocidade de iniciação de enraizamento;

E = número de plantas enraizadas a cada dia;

N = tempo decorrido (dias) desde a inoculação.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

Amostras de tecido foliar fresco (parte aérea e raiz) ($0,2\text{g} \pm 0,1$) foram coletadas e procedido o preparo do extrato hidroetanólico. A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico Folin-Denis (Horwitz, 1995). A leitura foi realizada espectrofotometricamente a 760 nm, os cálculos foram realizados com base na curva padrão de ácido tânico (0, 25, 50, 75, 100 e 200 mg L^{-1}) e os resultados expressos em mg de fenóis totais por grama de material vegetal.

DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Amostras de tecido foliar fresco (parte aérea e raiz) ($0,2\text{g} \pm 0,1$) foram coletadas, congeladas e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento da determinação da atividade das enzimas peroxidase (Putter, 1974), polifenoloxidase (Hyodo & Yang, 1971 modificado por Campos et al. 2004), catalase (Havir & Mchale, 1987) e dos teores de proteína solúvel (Bradford, 1976). A atividade da enzima foi expressa em unidade enzimática (UE). Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidade de absorvância por minuto.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa ASSISTAT (Assis & Silva, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1º Experimento: Influência do número de subcultivos no enraizamento *in vitro* do genótipo RB 92579.

Nas plantas submetidas a seis subcultivos a adição de auxina ao meio de cultivo promoveu o enraizamento do genótipo estudado, no entanto, observou-se um maior percentual de enraizamento (78,76%) com a adição do AIB que superou os demais tratamentos. Os sucessivos subcultivos foram desfavoráveis e ocasionaram um declínio no percentual de enraizamento observado no 12º subcultivo. O efeito do cultivo prolongado foi mais prejudicial nas plantas do tratamento controle que apresentaram 45,87% de redução na emissão radicular, enquanto que nas plantas do tratamento com adição de AIA observou-se a menor redução no percentual de enraizamento (7,24%) (Figura 5A).

Zucchi et al. (2002) não constataram efeito do número de subcultivos sobre a estabilidade genética de duas variedades de cana-de-açúcar (RB83-5486 e SP80-185). As condições químicas e físicas do cultivo *in vitro* podem, entretanto, alterar processos fisiológicos sem acarretar necessariamente em variabilidade genética. A alta umidade da atmosfera dos tubos de cultivo, por exemplo, afetam o mecanismo transpiratório e interferem no movimento das auxinas (Joyce et al., 2003). A exposição prolongada às condições estressantes do cultivo *in vitro* favorece o surgimento de aberrações típicas entre as quais se destacam a perda da totipotência que se traduz pela incapacidade de diferenciação celular (Cassells & Cury, 2001; Gaspar et al., 2002).

Ao duplicar o número de subcultivos (de seis para 12), as plantas da variedade RB 92579 apresentaram perda parcial da capacidade organogênica que se expressou como queda na emissão radicular. Dessa forma, observa-se um efeito benéfico dos ciclos de

multiplicação restritos ao 5º ou 6º subcultivos, evidenciando-se assim uma margem regenerativa satisfatória ao longo do processo de micropropagação, preservando o potencial organogênico do genótipo trabalhado e a produtividade total da micropropagação.

O emprego do AIB no 6º ciclo de multiplicação proporcionou melhor resultado quanto ao número de folhas e o aumento no número de subcultivos não prejudicou a emissão de folhas. Nesse aspecto, a adição de 3µM de AIA ao meio de cultivo foi o tratamento que promoveu maior formação de folhas (5,45 por planta) no 12º subcultivo (Figura 1B). Apenas para esta variável observou-se efeito positivo do aumento no número de subcultivos. Resultados contrários foram obtidos por Webber (2004) que, avaliando a influência do número de subcultivos na aclimatização de morangueiro, observou uma diminuição da ordem de 34% na formação foliar no genótipo Vila Nova, do 4º subcultivo para o 10º subcultivo.

A suplementação do meio de cultivo com 3µM de AIA proporcionou melhor taxa de multiplicação, traduzida pela emissão de perfilhos, da variedade RB 92579 até o 6º subcultivo, com uma média de 2,39 novas plantas/explante, superior aos demais tratamentos. Observou-se, no entanto, uma redução quanto ao número de perfilhos no 12º subcultivo em todos os tratamentos, sendo o tratamento controle o mais afetado, com uma média de 0,59 novas plantas/explante, representando uma redução na taxa de multiplicação acima de 64% (Figura 1C).

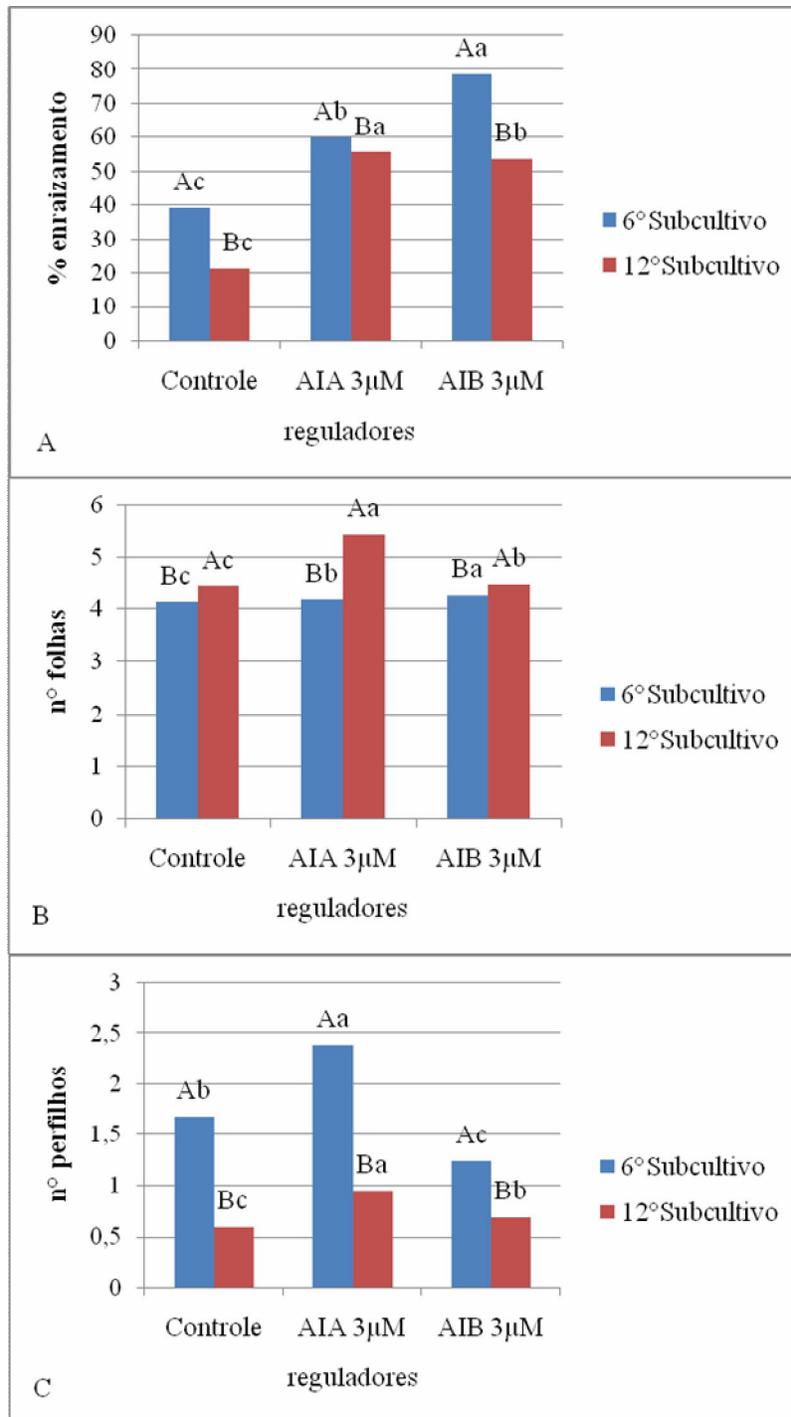


Figura 1. Percentual de enraizamento (A), n° de folhas (B) e n° de perfilhos (C) da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e em ausência desses constituintes (Testemunha). *Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade.

Resultados análogos quanto à redução na taxa de multiplicação foram obtidos por Flores et al., (2006) trabalhando com micropropagação de *Pfaffia tuberosa*. Esses autores registraram um declínio no número de brotos regenerados por explante, logo no 2º subcultivo, de um total de 5 ciclos de multiplicação. Na micropropagação de morangueiro a melhor taxa de multiplicação (1:7) no 3º subcultivo decresceu a 1:1,5 no 10º subcultivo (Webber, 2004). Por outro lado, há registros de aumento na formação de brotos em calos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) tanto nos tecidos novos [(4-12 subcultivos) 30 brotos/calos] como nos velhos [(mais de 30 subcultivos) 15 brotos/calos] mediante emprego de ácido ascórbico (0,4 a 0,8mM) no meio de cultivo (Pathel & Thorpe, 1988). Esses resultados confirmam a hipótese desses autores quanto ao retardo da perda da capacidade organogênica diante da utilização de compostos antioxidantes. Segundo Mantel (1994), as taxas de multiplicação variam com o genótipo e refletem a capacidade de formar a parte aérea. Verifica-se assim, o comprometimento da produtividade diante de numerosos subcultivos, reflexo da perda da capacidade organogênica, sendo esta variável quanto ao genótipo.

Segundo Gaspar et al., (2002) as causas para a perda da habilidade regenerativa são ainda pouco estudadas e variam de acordo com as circunstâncias do cultivo e da espécie. Conclui-se que independente da fonte de auxina utilizada (AIA ou AIB) a suplementação do meio de cultivo, proporcionou resultados satisfatórios quanto às variáveis percentual de enraizamento e número de perfilhos, até o 6º ciclo de multiplicação; os reguladores utilizados minimizaram os efeitos da perda da capacidade regenerativa retardando a mesma para o 12º subcultivo.

Diante do exposto, recomenda-se o emprego de AIB na concentração de 3 μM na indução do enraizamento *in vitro* do genótipo RB 92579 de cana-de-açúcar em ciclos de multiplicação e recomenda-se a avaliação do ponto de declínio entre o 6º e o 12º subcultivo para a variedade estudada, de forma a assegurar a expressão da totipotencialidade do genótipo e viabilizar resultados satisfatórios na etapa de aclimatização.

2º Experimento: Interações entre auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento *in vitro* do genótipo RB 92579 de cana-de-açúcar.

O percentual de enraizamento das plantas cultivadas em meio MS sem adição de auxinas e cofatores fenólicos (Tratamento Controle) foi de 21,25% (Tabela 1). O efeito do AIB foi melhor do que o do AIA na indução do enraizamento da variedade RB 92579. A combinação das auxinas com os cofatores fenólicos estimulou a emissão de raízes nessa etapa de indução (Figura 2). Quando tratadas com AIB em combinação com floroglucinol, as plantas apresentaram maior percentual de enraizamento do que quando cultivadas em meio MS acrescido de AIA. Os maiores percentuais de enraizamento (cerca de 60%) foram obtidos em meio com 3 μM de AIB associado ao floroglucinol (1,5 μM e 3 μM) (Tabela 1). Em combinação com o ácido cafeico o efeito do AIB foi reduzido, e o percentual de enraizamento não diferiu daquele induzido pelo AIA associado a esse fenólico, independente da concentração utilizada (1,5 μM e 3 μM) (Tabela 1). O emprego do AIA juntamente com o ácido cafeico proporcionou o melhor percentual de enraizamento (55,62%), enquanto que a utilização do AIA com floroglucinol reduziu significativamente o enraizamento em todas as concentrações empregadas (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de enraizamento da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB em combinação com distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol (1,5 µM e 3,0 µM) e em ausência desses constituintes (Testemunha)

Auxinas (3,0 µM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 µM	3,0 µM	1,5 µM	3,0 µM
AIA*	28,750 Cb	50,62 Aa	55,62 Aa	48,75 Bb	46,25 Bb
AIB	43,120 Ca	53,75 Ba	53,12 Ba	60,00 Aa	59,37 Aa
Testemunha = 21,25% ns			CV% = 18,00		

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

Dessa forma, observou-se que dependendo da fonte de auxina utilizada, bem como do co-fator fenólico, o enraizamento pode ser estimulado ou inibido, ficando evidente o sincronismo entre o AIB e o floroglucinol. Estes resultados corroboram com estudos prévios de Jones & Hatfield (1976) segundo eles, a adição ao meio de cultura de compostos fenólicos como ácido cafeico e floroglucinol juntamente com auxinas elevam a percentagem de enraizamento.

Segundo Souza & Pereira, (2007), quando os polímeros de ortho-dihidroxifenóis (floroglucinol dentre outros) agem como protetores de auxinas, têm a função de manter os tecidos em um estado reduzido, agindo como antioxidantes e mantendo um baixo potencial redox. Os orthodihidroxifenóis específicos (cofatores de enraizamento) são produzidos nas folhas e brotos e translocados à região de enraizamento, onde, junto com auxinas e polifenoloxidasas, dão origem a um complexo estimulador de enraizamento que conduz à iniciação e crescimento do primórdio radicular. Para a formação do primórdio radicular, o complexo auxina-fenol é formado através de polifenoloxidasas.

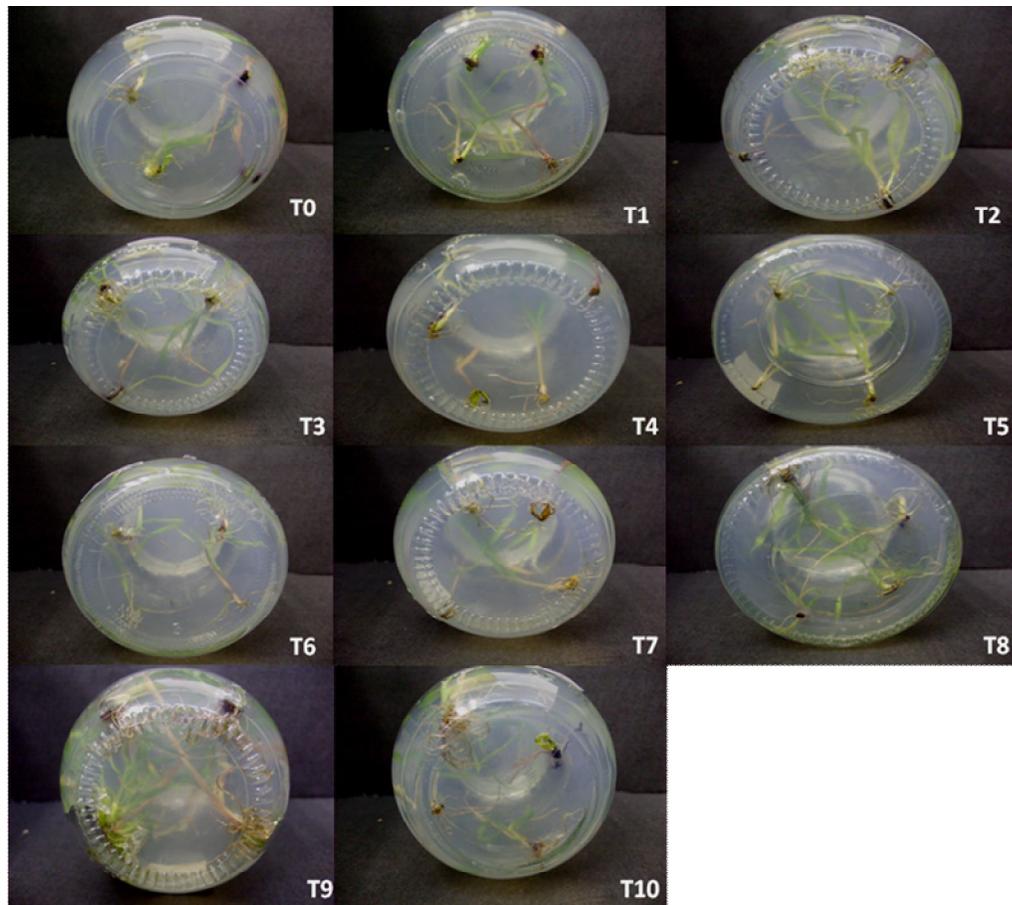


Figura 2. Desenvolvimento radicular da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μ M de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

A elevação de níveis endógenos de floroglucinol em brotos favorece a iniciação de raízes durante a fase auxina-sensível, tendo uma ação sinérgica com a auxina. Nesse caso, a auxina pode agir como um protetor do floroglucinol que servirá de substrato alternativo para a AIA peroxidase e/ou oxidase e, conseqüentemente, os níveis de AIA endógenos permanecerão elevados (Souza & Pereira, 2007). De um modo geral, o floroglucinol aumenta o índice de enraizamento, provavelmente pela influência no metabolismo da auxina agindo como inibidor da AIA oxidase (Davis et al., 1988; De Klerk et al., 1999; Gur et al., 1988).

Zanol et al. (1998) compartilham de resultados análogos quanto ao emprego conjunto de AIB e floroglucinol no enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de macieira Marubakaido, enfatizando a eficácia destes quanto ao aumento do percentual de enraizamento e na aceleração da emergência radicular. Sharifian et al. (2009), trabalhando com enraizamento *in vitro* de noqueira persa (*Juglans regia*) obtiveram resultado inferior (45% de enraizamento). Esse percentual, no entanto, reflete seu melhor resultado utilizando floroglucinol isoladamente, porém em uma concentração bem mais elevada (1 mM); ainda sim, os autores ressaltam que a concentração deste fenol é um dos fatores que também influenciam o enraizamento mesmo sendo utilizado na forma isolada ou em associação com auxinas.

Quanto ao índice de velocidade de iniciação de enraizamento (IVE), no tratamento contendo somente AIA (T1) observou-se o maior IVE no segundo dia após a inoculação (9,42 plantas enraizadas aos 2 dias). Para este período de avaliação o IVE no tratamento com AIA (3,0 μ M) só não foi superior ao daquele registrado no tratamento com AIA e 1,5 μ M de ácido cafeico (Figura 3). Aos seis dias de tratamento o IVE das plantas tratadas com apenas AIA superou os demais. Houve uma diminuição gradativa da velocidade de emissão de raízes ao longo do período experimental, em todos os tratamentos. Segundo Gaspar & Hofinger (1988), após a aplicação de uma auxina exógena, geralmente no período de 72 a 120 horas, ocorre um aumento no nível endógeno de auxina endógena e verifica-se o início da formação da maioria das raízes primárias. De acordo com alguns autores, após esse tempo as auxinas não são mais necessárias, sendo inibitórias para a formação do meristema radicular (De Klerk, et al., 1999).

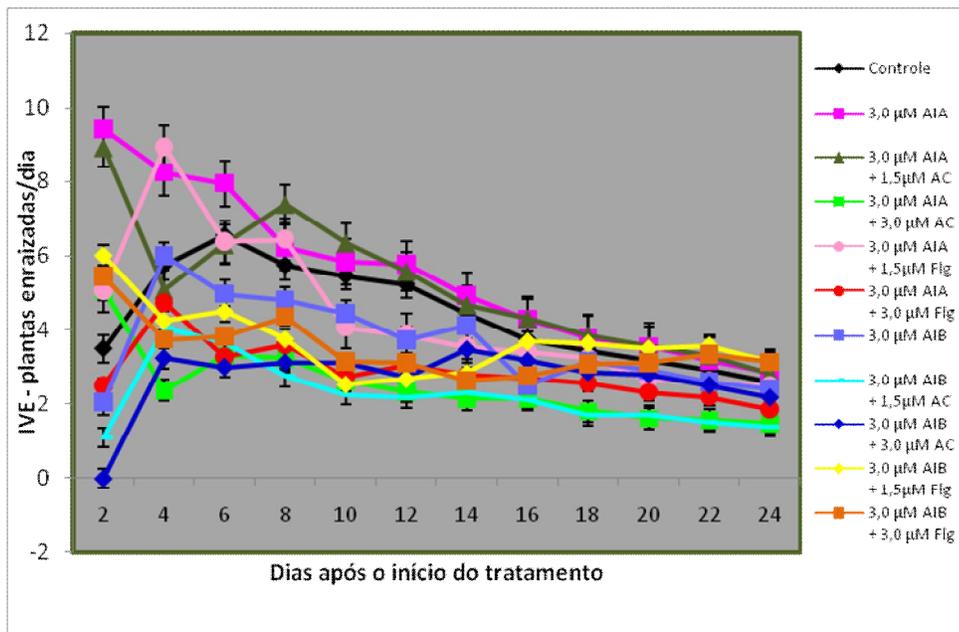


Figura 3. Índice de velocidade de enraizamento (IVE) da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 ao 24º dia de cultivo em meio MS acrescido de distintas combinações de 3,0 μM de AIA ou AIB com ácido cafeico ou floroglucinol, a 1,5 ou 3,0 μM e em ausência desses constituintes (Testemunha).

No 12º dia as plantas submetidas aos tratamentos controle, apenas com AIA e com AIA + 1,5 μM de ácido cafeico apresentaram IVE superior as demais. Essas diferenças, entretanto, se anularam aos 24 dias de cultivo (Figura 3). De acordo com Kerbauy (2004), o AIA livre é a forma biologicamente ativa desta auxina, no entanto, no vegetal o maior conteúdo de AIA está na forma conjugada. Em condições *in vitro*, o AIA é degradado por uma variedade de agentes, que incluem: a luz visível, ácidos, radiações ultravioleta e ionizante; enquanto que no vegetal o AIA é inativado concomitantemente com a ação promotora do crescimento. Sua degradação ocorre por oxidação, que pode ocorrer tanto na cadeia lateral (com descarboxilação) quanto no anel indólico (sem descarboxilação). A descarboxilação oxidativa do AIA é catalisada por enzimas do tipo peroxidase (AIA-oxidase), estas existem em numerosas formas isoenzimáticas nas plantas.

O AIB, além de agir como auxina, pode ser ele próprio uma forma de armazenamento de AIA, já que, por um mecanismo de oxidação que ocorre nos

peroxissomos, esse composto pode se converter em AIA livre (Bartel et al., 2001). Desta forma, explica-se os maiores IVEs observados nos tratamentos contendo AIA na forma isolada e associada com ácido cafeico e floroglucinol, não sendo observado o efeito acelerador do AIB descrito por Zanol et al. (1998).

Quanto ao comprimento radicular, nos tratamentos contendo AIB e floroglucinol, foram superiores, diferindo significativamente dos demais tratamentos com média de 7,07 cm e 8,42 cm respectivamente (Tabela 2). Nos tratamentos contendo AIB isolado e combinado com floroglucinol o comprimento das raízes superou os tratamentos contendo AIA na forma isolada e combinada com ácido cafeico, com exceção do tratamento contendo AIA e 1,5 µM de ácido cafeico; o meio composto por AIA e floroglucinol 3,0 µM promoveu a superioridade significativa deste com relação aos demais compostos por AIA isolado e combinado com ácido cafeico (Tabela 2).

Tabela 2. Comprimento (cm) do sistema radicular da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas (3,0 µM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 µM	3,0 µM	1,5 µM	3,0 µM
AIA*	4,138 Db*	5,664 BCa	5,377 Cb	6,160 Bb	7,540 Aa
AIB	6,010 Ba	5,550 Ba	6,110 Ba	7,070 Aa	8,420 Aa
Testemunha = 4,77 > T₁					CV% = 9,94

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

Avaliando o desenvolvimento *in vitro* de hipocótilos de feijão (*Phaseolus aureus*), Batish et al., (2008) obtiveram maior comprimento radicular (7,73 cm) utilizando ácido cafeico na concentração de 1 µM; sendo este valor inferior à maior média obtida nesse experimento. Já Sharifian et al., (2009) trabalhando com enraizamento *in vitro* de noqueira persa (*Juglans regia*) obtiveram cerca de 0,35 cm utilizando 1 mM de floroglucinol isoladamente. Segundo Grattapaglia & Machado (1998) as diferenças de

resultados, quanto a ação de fenóis sobre a indução de raízes adventícias *in vitro* estão relacionadas aos fatores genéticos, condições fisiológicas da planta e ao tempo de exposição dos explantes à ação de fenóis e auxinas. McCown (1988) relata que o efeito dos compostos fenólicos como o floroglucinol, ácido cafeico dentre outros; são sinérgicos com auxinas, porém a resposta é dependente do genótipo e de pré condições da cultura.

A adição de ácido cafeico ou floroglucinol em conjunto com AIA (3,0 μM) nas concentrações de 1,5 μM ou 3,0 μM não proporcionou diferença significativa quanto ao peso fresco das raízes. No entanto, o tratamento contendo AIB e ácido cafeico 3,0 μM promoveu maior ganho de biomassa radicular, com média de 0,057 g sendo superior estatisticamente à todos os tratamentos (Tabela 3). Resultados análogos foram obtidos por Wu et al., (2007) ao trabalharem com enraizamento *in vitro* de *Proctea cynaroides* utilizando meio MS acrescido de 50 mg L^{-1} de ácido 3,4-dihidroxibenzóico por 20 dias. No entanto, o ganho máximo de biomassa fresca radicular (0,26 g) foi obtido com 100 mg L^{-1} deste cofator. Assim, temos uma estreita relação entre a estimulação e inibição para indução da rizogênese em diversas espécies, sendo a concentração e o tipo do composto fenólico empregado fatores decisivos para o processo de enraizamento *in vitro*.

Tabela 3. Peso fresco (g) radicular da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas (3,0 μM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 μM	3,0 μM	1,5 μM	3,0 μM
AIA*	0,016 Aa*	0,014 Ab	0,022 Ab	0,028 Aa	0,019 Aa
AIB	0,013 Ba	0,030 Ba	0,057 Aa	0,021 Ba	0,024 Ba
Testemunha = 0,015 > T ₂ ,T ₆				CV% = 9,94	

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

O emprego do AIA em conjunto com 3,0 μM de floroglucinol proporcionou maior altura da parte aérea (22,21cm) embora não tenha diferenciado significativamente da combinação de AIA e 3,0 μM de ácido cafeico (Tabela 4; Figura 4). Todavia, foi superior estatisticamente aos tratamentos contendo AIA isoladamente (T1), AIA e ácido cafeico 1,5 μM (T2), AIA e floroglucinol 1,5 μM ; e a todos os tratamentos contendo AIB isolado ou combinado com ácido cafeico e floroglucinol. Já Batish et al., (2008) obtiveram 20,21cm de parte aérea em mudas de feijão (*Phaseolus aureus*) cultivadas *in vitro* utilizando 1 μM de ácido cafeico, este valor é análogo ao obtido neste experimento (20,47cm); no entanto utilizando 1,5 μM de ácido cafeico em conjunto com AIA (T2). Ainda sim, os autores observaram o efeito inibitório do crescimento do ácido cafeico sobre as mudas de feijão, descritos por Rice (1984); Blum (1996); Einhellig (1996); Mizutani (1999) os quais relatam efeitos inibitórios do ácido cafeico na germinação de sementes e crescimento de diversas espécies vegetais.

Tabela 4. Comprimento (cm) da parte aérea da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas (3,0 μM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 μM	3,0 μM	1,5 μM	3,0 μM
AIA*	17,200 Ca *	20,470 Ba	21,350 ABa	20,530 Ba	22,210 Aa
AIB	15,340 Cb	18,010 Ab	18,495 Ab	15,400 Bb	18,350 Ab
Test = 13,20 < todos os tratamentos					CV% = 6,26

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

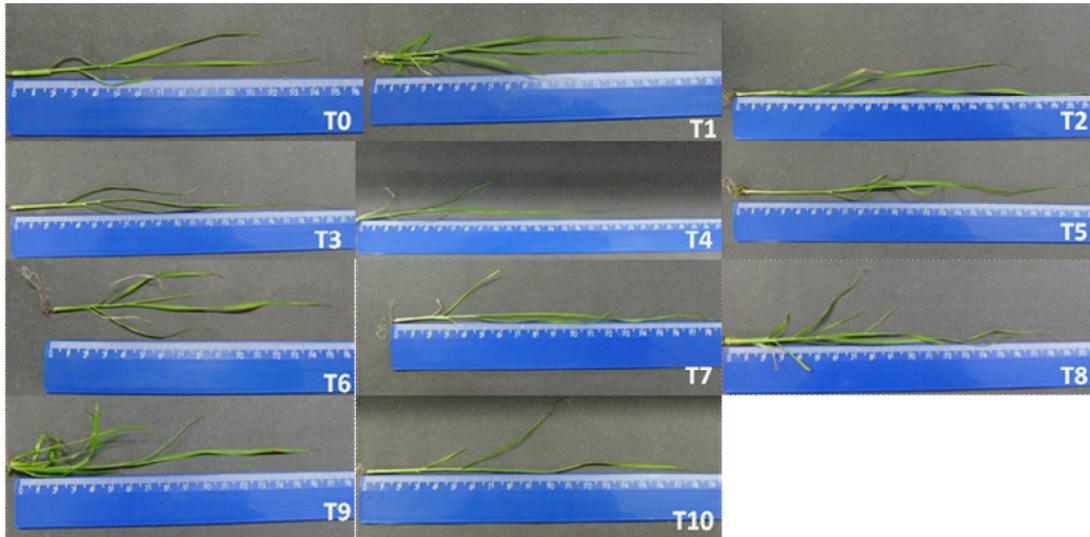


Figura 4. Comprimento da parte aérea da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Quanto à biomassa fresca da parte aérea, não se observou diferença significativa entre os tratamentos contendo AIA isolado ou combinado com ácido cafeico ou floroglucinol (1,5 μM ou 3,0 μM) (Tabela 5). Já o emprego do AIB combinado com ácido cafeico (3,0 μM) proporcionou resultado significativo, sendo superior aos demais tratamentos (0,338 g) (Tabela 5). Esses valores são superiores aos obtidos por Rodriguez et al., (2008) ao trabalharem com micropropagação de cana-de-açúcar em biorreatores de imersão temporária (BIT), os quais obtiveram média de 0,31g de biomassa fresca de parte aérea de cana-de-açúcar após 45 dias em meio de cultivo acrescido de 2,88 μM de ácido giberélico.

Tabela 5. Peso fresco (g) da parte aérea da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha)

Auxinas (3,0 μM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 μM	3,0 μM	1,5 μM	3,0 μM
AIA*	0,101 Aa *	0,117 Aa	0,121 Ab	0,079 Ab	0,109 Ab
AIB	0,086 Da	0,110 CDa	0,338 Aa	0,184 BCa	0,2250 Ba
Test = 0,087 > T ₄ , T ₆					CV% = 11,14

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

O tratamento contendo AIB associado a 3,0 μM de ácido cafeico promoveu maiores médias quanto ao número de perfilhos enraizados ou não, sendo superiores aos demais tratamentos. O emprego do AIA na forma isolada ou em conjunto com ácido cafeico ou floroglucinol não proporcionou diferença significativa com relação ao número de perfilhos e número de perfilhos enraizados (Tabela 6 e 7).

Sharifian et al., (2009) trabalhando com enraizamento *in vitro* de noqueira persa (*Juglans regia*) obtiveram melhores médias de perfilhos (4,58) utilizando 2 mM de floroglucinol isoladamente. Dessa forma, essas diferenças de respostas envolvem fatores específicos, genotípicos, bioquímicos; bem como a concentração e o tipo do composto fenólico utilizado.

Khan et al. (2009), trabalhando com a micropropagação de três genótipos de cana-de-açúcar obtiveram resultado superior (3,5 perfilhos/planta), todavia a melhor média de perfilhamento (5,83 perfilhos/planta) foi obtida para o tratamento contendo 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ GA₃. Roy & Kabir (2007), trabalhando com a micropropagação da variedade Isd 32 obtiveram cerca de 17 perfilhos/planta com a concentração de 1,5 mg L⁻¹ de BA + 0,5 mg L⁻¹ de ANA.

Tabela 6 Número de perfilhos da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas (3,0 μM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 μM	3,0 μM	1,5 μM	3,0 μM
AIA*	0,950 Aa *	1,225 Aa	1,000 Ab	0,500 Ab	0,600 Ab
AIB	0,700 Ba	0,700 Ba	1,900 Aa	1,200 ABa	1,300 ABa
Test = 0,6 < todos os tratamentos					CV% = 12,89

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

Tabela 7. Número de perfilhos enraizados da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas (3,0 μM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 μM	3,0 μM	1,5 μM	3,0 μM
AIA*	0,500 Aa*	0,800 Aa	0,200 Ab	0,300 Ab	0,500 Aa
AIB	0,400 Ba	0,600 Ba	1,400 Aa	1,000 ABa	1,000 ABa
Test = 0,6 > T ₁ , T ₃ , T ₄ , T ₅ , T ₆ .					CV% = 10,74

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

Quanto ao número de folhas, os tratamentos contendo AIA na forma isolada ou combinado com ácido cafeico 1,5 μM e floroglucinol (1,5 μM e 3,0 μM) não diferiram significativamente entre si, diferindo apenas de T3 (AIA + ácido cafeico 3,0 μM); no entanto, o tratamento 1 (AIA) proporcionou a maior média (5,46 folhas) (Tabela 8).

Já o emprego do AIB isolado ou em conjunto com ácido cafeico não promoveu diferenças significativas para esta variável. Nesses resultados, não observou-se ação benéfica da adição ao meio de cultivo de compostos fenólicos para este parâmetro.

Dados superiores para esta variável foram obtidos por Khan et al. (2008), com média de 5,66 folhas na micropropagação das variedades de cana-de-açúcar CP-77-400 e CPF-237. Esses resultados, entretanto, foram obtidos em meios contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ Kin + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ GA₃.

Tabela 8. Número de folhas da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com $3,0 \mu\text{M}$ de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas ($3,0 \mu\text{M}$)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 μM	3,0 μM	1,5 μM	3,0 μM
AIA*	5,468 Aa*	5,000 ABa	4,466 Ba	4,700 ABa	4,600 ABa
AIB	4,500 Ab	4,500 Aa	4,700 Aa	4,700 Aa	4,800 Aa
Test = $4,47 > T_3, T_6$.					CV% = 15,16

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

TEOR DE FENÓIS TOTAIS, ATIVIDADE DA PEROXIDASE (E.C. 1.11.1.7) E DA POLIFENOLOXIDASE (E.C. 1.14.18.1)

O tratamento com adição de AIA foi superior quanto ao teor de fenóis nas plantas de todos os tratamentos envolvendo esta auxina combinada com ácido cafeico e floroglucinol, e ao tratamento envolvendo apenas AIB (Tabela 9). O tratamento contendo AIB em conjunto com 3,0 µM de floroglucinol apresentou maior teor de fenóis sendo superior aos demais tratamentos envolvendo esta auxina isolada ou associada com ácido cafeico (1,5 µM e 3,0 µM) e floroglucinol (1,5 µM) (Tabela 9).

As maiores médias de fenóis coincidiram com os maiores percentuais de enraizamento observados nesse experimento (Tabela 1) e variaram inversamente quanto à atividade da peroxidase e da polifenoloxidase (Figura 5); a peroxidase apresentou atividade significativa no tratamento envolvendo AIA e ácido cafeico 1,5µM sendo superior aos demais tratamentos (Tabela 10).

Tabela 9. Teor de fenóis totais expresso mg/g de tecido vegetal fresco da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas (3,0 µM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 µM	3,0 µM	1,5 µM	3,0 µM
AIA*	49.2856 Aa	7.3709 Cb	8.6447 Cb	11.6978 Bb	8.0659 Cb
AIB	5.6078 Bb	11.2510 Ba	12.7034 Ba	18.6540 Ba	49.2014 Aa

Test = 6.697 > T₆.

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas (Interação reguladores x Compostos fenólicos).

A menor atividade da peroxidase foi verificada nos tratamentos contendo 3,0 μM de floroglucinol associados à AIA ou AIB (Tabela 10, Figura 5B); resultados análogos à este foram mencionados por Zanol et al., (1998) ao utilizar AIB juntamente com floroglucinol no enraizamento *in vitro* de porta enxerto de macieira. Porém, os autores relatam aumento significativo da peroxidase mediante utilização isolada de floroglucinol num gradiente de 0 a 162 mg/L. De acordo com alguns pesquisadores (Davis et al., 1988; De Klerk et al., 1999; Gur et al., 1988), o floroglucinol é mencionado exclusivamente como promotor do enraizamento adventício e inibidor da AIA-oxidase.

A polifenoloxidase, apresentou atividade significativa no tratamento composto por AIA e floroglucinol 1,5 μM sendo superior aos demais tratamentos. O emprego de AIA isolado ou combinado com os fenóis (ácido cafeico e floroglucinol) proporcionou um incremento na atividade da polifenoloxidase, nestes tratamentos diferenciando-os dos que continham AIB na forma isolada e combinada com fenóis (Tabela 11).

Tabela 10. Atividade da peroxidase (POD) expressa em U/mg de proteína da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas (3,0 μM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 μM	3,0 μM	1,5 μM	3,0 μM
AIA*	20921 Da *	42096 Aa	37671 Ba	22287 Ca	13991 Eb
AIB	15940 Db	17990 Ab	17644 Bb	12653 Eb	17186 Ca

Test = 24276 > T₁, T₄, T₅, T₆,

T₇, T₈, T₉, T₁₀.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas (Interação reguladores x Compostos fenólicos).

Tabela 11. Atividade da Polifenoloxidase (PPO) expressa em U/mg de proteína da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas (3,0 µM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 µM	3,0 µM	1,5 µM	3,0 µM
AIA*	11498 Da *	16712 Ba	16127 Ca	16952 Aa	10970 Ea
AIB	11060 Bb	11318 Ab	9846 Eb	9877 Db	9975 Cb

Test = 12389 > T₁, T₅, T₆, T₇,

T₈, T₉, T₁₀.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas (Interação reguladores x Compostos fenólicos).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), o papel dos compostos fenólicos seria o de auxiliar na manutenção de elevados teores endógenos de AIA, agindo como antioxidantes inibindo a oxidação do AIA (Debergh & Read, 1991). Wilson & Van Staden (1990) e Hausman (1993) propuseram que a capacidade de alguns fenólicos (polifenóis) em promover a formação de raízes adventícias seria por inibição da oxidação da auxina e reações de oxidação em geral, mantendo a célula em estado reduzido e, assim, permitir a divisão celular.

Segundo Souza & Pereira (2007), os compostos fenólicos podem agir como protetores de auxinas endógenas, servindo de substrato alternativo para a AIA-oxidase, enzima esta pertencente ao grupo das peroxidases.

As peroxidases atuam na biossíntese do etileno, na lignificação, além da destruição das auxinas, devido ao fato de estas se apresentarem em muitas formas moleculares participando de diferentes reações bioquímicas (Dencheva & Klisurka, 1982).

Segundo Svalheim & Robertsen (1990), os fenólicos como o ácido cafeico, constituem um grupo de substâncias de grande espectro no metabolismo vegetal, sendo os substratos específicos das peroxidases e um dos substratos das polifenoloxidasas (Gomes et al., 2001); estes compostos atuam na regulação da organogênese, interagindo com reguladores de crescimento (Ozyigit et al., 2007). Segundo Musacchi, (1994) possuem atividade reguladora auxínica, sendo suficientes para regular a síntese de AIA-oxidase inibindo assim a oxidação do AIA promovendo o crescimento das plantas.

Assim, explica-se o balanço inversamente proporcional da atividade da peroxidase em relação ao teor de fenóis obtidos nesse trabalho. Confirmando-se assim, os resultados obtidos previamente por Kanmegne & Omokolo (2003) trabalhando com enraizamento *in vitro* de *Xanthosoma sagittifolium* L. em meio suplementado com 5 µM de ANA por 20 dias. Desse modo, sugere-se que tais compostos estão interrelacionados, podendo ser importantes marcadores fisiológicos e bioquímicos da rizogênese (Thorpe & Meyer, 1974; Syros et al., 2004; Metaxas et al., 2004).

O maior teor de fenóis bem como as maiores atividades da peroxidase e polifenoloxidase foram observadas na parte radicular quando comparado com a parte aérea em todos tratamentos desse experimento (Figura 5B,5C); no entanto a atividade da peroxidase e da polifenoloxidase foi maior na parte aérea no tratamento contendo apenas auxinas; e a atividade da polifenoloxidase foi maior para a parte aérea, para o tratamento contendo floroglucinol 3,0 µM (Figura 5A).

A maior atividade da peroxidase foi observada no tratamento envolvendo 3,0 µM de ácido cafeico (Figura 5B), dessa forma esse composto juntamente com AIB proporcionaram maior ganho de biomassa fresca da parte aérea e radicular (Tabelas 4 e 5), assim, sugere-se o envolvimento da peroxidase como sinalizadora de processos

morfogênicos descritos previamente por Gaspar et al., (1982) e posteriormente confirmados por Mato et al., (1988) e Amarante et al., (2001). No entanto, a atividade desta enzima pode ser alterada sob condições de estresse oxidativo, fato este constatado por Batish et al., (2008) ao trabalhar com mudas de feijão (*Phaseolus aureus*) *in vitro* utilizando diversas concentrações de ácido cafeico (1-1000 μM) no meio de cultivo, sendo a concentração de 100 μM a que proporcionou aumento significativo na atividade da peroxidase e polifenoloxidase e efeitos inibitórios na morfogênese dos brotos.

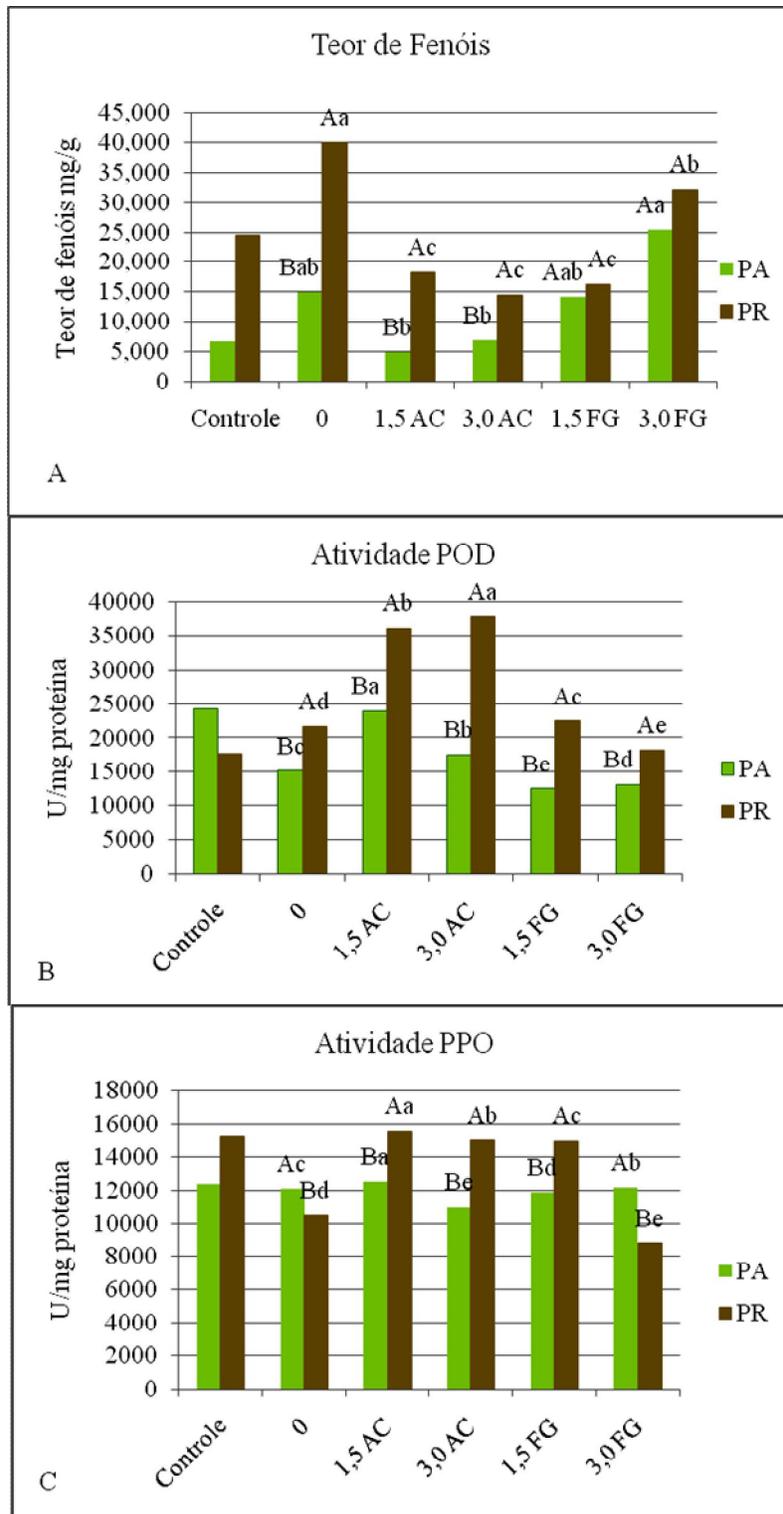


Figura 5. Teor de fenóis (A); atividade da peroxidase - POD (B); e atividade da polifenoloxidase - PPO (C) na variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μ M de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol em ausência desses constituintes (Controle). *Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade.

ATIVIDADE ESPECÍFICA DA CATALASE (E.C. 1.11.1.6)

Os tratamentos contendo AIA em conjunto com 3 µM de floroglucinol (T4) e AIB contendo 1,5 µM de floroglucinol (T9), proporcionaram maior atividade da catalase sendo significativamente superiores aos demais tratamentos. Os tratamentos contendo apenas AIA e AIB combinado com 3,0 µM de floroglucinol promoveram menor atividade da catalase (Tabela 12). Observou-se um aumento na atividade da catalase, em resposta ao aumento da concentração do ácido cafeico e floroglucinol nos tratamentos envolvendo o AIA isolado ou combinado com os compostos fenólicos e os tratamentos envolvendo AIB de forma isolada e combinado com ácido cafeico. No entanto, os tratamentos envolvendo AIB e floroglucinol não seguiram essa tendência (Tabela 12). Singh (2008), trabalhando com ácido cafeico como inibidor do enraizamento *in vitro*, observou tendência similar quanto ao aumento na atividade de enzimas sequestradoras de ROS como a catalase, em resposta ao aumento na concentração do ácido cafeico. Este aumento na atividade de enzimas antioxidante está de acordo com estudos anteriores onde são mencionados que os ácidos fenólicos aumentam a atividade de enzimas antioxidantes (Baziramakenga et al., 1995; Ju et al., (2007).

Tabela 12. Atividade da Catalase (CAT) expressa em U/mg de proteína da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 µM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas (3,0 µM)	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 µM	3,0 µM	1,5 µM	3,0 µM
AIA*	1511 Eb*	2234 Db	3678 Ba	3338 Cb	3938 Aa
AIB	2783 Da	2836 Ca	3247 Bb	3932 Aa	1512 Eb

Test = 1700 > T₁ e T₁₀.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas (Interação reguladores x Compostos fenólicos).

As plantas dos tratamentos contendo AIA apresentaram maior atividade da catalase na parte radicular, e aquelas dos tratamentos contendo AIB apresentaram maior atividade enzimática na parte aérea sendo ambos os tratamentos estatisticamente superiores aos demais (Tabela 13). Já nos tratamentos contendo 1,5 μM de floroglucinol, foram registrados os maiores valores de atividade enzimática na parte aérea, sendo estatisticamente superiores, enquanto que na parte radicular o tratamento envolvendo 3,0 μM de ácido cafeico foi significativamente superior aos demais (Tabela 14).

Tabela 13. Atividade da Catalase (CAT) expressa em U/mg de proteína da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha).

Auxinas (3,0 μM)	Partes da planta	
	Parte aérea	Raízes
AIA*	2526 Bb*	3353 Aa
AIB	3006 Aa	2718 Bb

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas (Interação reguladores x Interação partes da planta).

Tabela 14. Atividade da Catalase (CAT) expressa em U/mg de proteína da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 3,0 μM de AIA ou AIB e distintas concentrações de ácido cafeico ou floroglucinol e em ausência desses constituintes (Testemunha) (PA – Parte aérea; PR – Parte radicular).

Partes Planta	Cofatores fenólicos				
	0	Ácido cafeico		Floroglucinol	
		1,5 μM	3,0 μM	1,5 μM	3,0 μM
PA*	2099 Be *	2348 Bc	2959 Bb	4087 Aa	2335 Bd
PR	2194 Ae	2723 Ad	3965 Aa	3183 Bb	3114 Ac

Test PA = 1700 < todos os tratamentos.

Test PR = 1476 < todos os tratamentos.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam linhas e as letras minúsculas comparam colunas (Interação partes da planta x Compostos fenólicos).

CONCLUSÕES GERAIS

Doze subcultivos reduz a capacidade de enraizamento *in vitro* da variedade RB 92579 quando comparado com seis subcultivos.

O tratamento contendo 3,0 μM de AIB e 3,0 μM de ácido cafeico é o mais indicado para indução de enraizamento do genótipo RB 92579, bem como para obtenção de mudas com potencial para a aclimatização.

O ácido cafeico induz o aumento da atividade da peroxidase e da polifenoloxidase apenas no sistema radicular que coincide com maior enraizamento e ganho de massa fresca da parte aérea e raízes.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. B. et al. Phenolic metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. **Plant Science**, v.171, p.147-154, 2006.
- ALI, S. N. A. et al. An Efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Pakistanian Journal Botany**, p. 139-149, 2008.
- AMARANTE, L. et al. Influências do ácido naftaleno acético e escuro e atividade da peroxidase no enraizamento *in vitro* de aspargo (*Asparagus officinalis* L.) **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7 n.1, p. 4-9. jan-abr, 2001.
- ANBALAGAN, S., A. KALAMANI & M. SAKILA. *In vitro* propagation of sugarcane: nature of callus, direct regeneration, regeneration through callus and morphological variations. **Research On Crops**, 1(2): 138-140, 2000.
- ANITA, P. et al. Efficient and cost- effective micropropagation of two early maturing varieties of sugarcane (*Saccharum* spp.) **Indian Sugar**, 50: 611–618, 2000.
- ASSIS, E SILVA. F.. **Assistat**. Versão 7.3 beta. 2006.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.1, , 1998, p.261-96.
- BANDEIRA, F. S. et al. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v.31, n.5, p.773-781, 2007.
- BARTEL, B. et al. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid b-oxidation. **Journal of Plant Growth Regulation** 20: 198–216, 2001.
- BATISH, D. R. et al. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*) **Plant Physiology**, Ed. 165 p. 297-305, 2008.
- BAZIRAMAKENGA, R.; LEROUX, G. D. & SIMARD, R. R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. **Journal Chemistry Ecology** 21, 1271-1285, 1995.
- BERED, F. et al. Regeneração de plantas de aveia a partir de calos embriogênicos e organogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.1827-1833, 1998.
- BLUM, U. Allelopathic interactions involving phenolic acids. **Journal Nematology**. 28: p.259–67, 1996.
- BORÉM, A. & VIEIRA, M.L.C. **Glossário de Biotecnologia**. Viçosa, Editora Universidade Federal de Viçosa, 2005 p.126.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, , 1976, p.248-254.
- CAMPOS, A.D.et al. Peroxidase and polyphenol oxidase activity in bean anthracnose resistance. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p. 637-643, 2004.
- CASSELLS, A. C. Aseptic microhydroponics: a strategy to advance microplant development. **Acta Horticulturae**, 530:187–194; 2000.
- CASSELLS, A.C.; CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.145-157, 2001.
- CHEEMA, R.; GUPTA, J. N Plants regenerated from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Current Science**, 68(6) p.650-653, 1995.
- DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, v.2., p. 315, 1988.
- DEBERG, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERG, P.C, ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer academic press, p.1-13, 1991.
- DEKLERK G-J, VAN DER KRIEKEN W, DE JONG JC. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In Vitro Cell Development Biology Plant**, p.189–99, 1999.
- DEL RÍO, L.A. et al. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**, v.141, p.330-335, 2006.
- DENCHEVA, A., KLISURKA, D. Interaction between peroxidases and IAA-oxidase in the course of growth and differentiation of the plant cells. **Physiologie Végétale**, Paris, v.20, n.3, p.385-394, 1982.
- DESJARDINS, Y. Carbon metabolism in leaves of micropropagated sugar cane during acclimatization phase. **In vitro Cell, Development Biology**, p.533-539, 2008.
- DEWIR, Y.H.et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, v.58, p.93-99, 2006.
- EINHELLIG , F.A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**, 88: p.886–93, 1996.
- ERIG, C.A.; SCHULG, M.W. Estabelecimento *in vitro* de plantas de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivares MC, Adans e Portugal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.8, n.2, p.107-115, 2003.
- FAO. Acesso em: 2009. Disponível em: <http://apps.fao.org>.

- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T. Otimização da micropropagação de *Pfafia tuberosa* (SPRENG.) HICKEN. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.107-115, 2006.
- FORD, Y.Y. et al. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, v.10, p.1-11, 2001.
- GASPAR, T. et al. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**, v.37, p.263-285, 2002
- GASPAR, T. et al. Loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 36, p. 171-181 , 2002.
- GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, . v.1p., 1998, 183-260.
- GASPAR, T.H. et al. **Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Genève, Université de Genève, Centre de Botanique., 313p 1982.
- GOMES, M.R.A. et al. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) **Ciência Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, 21(1): 69-72, jan.-abr. 2001.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH. v.1p., 1998, 183-260.
- GUR, A.; GAD AE, HAAS E. Rooting of apple rotstock clones as related to phenols and their oxidation. **Acta Horticulturae**, p.160–166, 1988.
- HARTMANN, H.T., KESTER, D. E., DAVIES F.T **Plant Propagation**. Singapore Prentice-Hall, p.647, 1990.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Plant propagation principles and practices**. 2. ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, p.702, 1968.
- HAUSMAN, J.F. Changes in peroxidase activity, auxin level and level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, 13: p.263-268, 1993.
- HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Physiologia Plantarum**, v.84, p.450-455, 1987.
- HEINZ, D.J.; MEE, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science**, v.9p.46-348, 1969.
- HENDRE, R.R. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. **Sugarcane**, p.5-8, 1983.

- HENDRE, R.R. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. **Sugarcane**, p.5-8, 1983.
- HORWITZ, H. Official method of analysis of the association of official agricultural chemists. 8 ed. **As. Agricultural Chemistry**, Washington, p.144, 1995.
- HUDÁK, I. et al. Influence of osmotic stress on biochemical properties in potato. **Acta Horticulturae** p.237-239, 2009.
- HUSSEY, G. Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L.A; ALDERSON, P.G. **Plant tissue culture and its agriculture applications**. London, Butterworths, , 1986, p. 69-84.
- HYODO, H.; YANG, S.F. Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonia lyase in pea seedlings. **Plant Physiology**, 47:765-770, 1971.
- JONES, O.P. & HATFIELD, S.G.C. Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. **Journal of Horticultural Science**, 5:495-499,1976.
- JOYCE, S.M. et al. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.103-121, 2003
- KANMEGNE, G.; OMOKOLO, D.N. Changes in phenol content and peroxidase activity during *in vitro* organogenesis in *Xanthosoma sagittifolium* L. **Plant Growth Regulation**, 40: 53–57, 2003.
- KERBAUY, G.B.; **Fisiologia Vegetal**, 4° ed. Guanabara Koogan Rio de Janeiro, 2004.
- KHAN, S.A. et al. Effect of cytokinins on shoot multiplication in three elite sugarcane varieties. **Pakistanian Journal. Botany**, 41(4): p. 1651-1658, 2009.
- KLERK, G.J. How to measure somaclonal variation. **Acta Botanica Neerlandica**. Oxford, V. 38 (2), p. 129-144, 1990.
- KOZAY, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, p. 49-56, 1997.
- KRIKORIAN, A.D Propagación clonal *in vitro*. In: ROCA, W.M. E MROGINSKI. L.A., (Ed.). **Cultivo de tejidos en al agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, CIAT, 1991, p. 95-25.
- LAL, N & SINGH, H.N.. Rapid clonal multiplication of sugarcane through tissue culture. **Plant Tissue Culture**, Ed.4: p. 1-7, 1994.
- LEE, T.T. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Ed.10(1), p.47-55, 1987.
- LIBIK, M.; et al. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus culture of the ice plant. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.23, p.834-841, 2005.

- LIMA, C.C.M. **Uso de aditivos e cofatores na rizogênese de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro*.** 99p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo Piracicaba, 1998, Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais).
- LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.2, p. 177-184, 2002.
- MANTEL, S.H. et al. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas.** Ribeirão Preto, SBG, 344p. 1994.
- MATO, M. C.; RÚA, M. L.; FERRO, E. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.72, p.84-88, 1988.
- McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**, Portland: Dioscorides Press, v.2, , 1988, p.289-302.
- METAXAS, D. et al. Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. **Plant Growth Regulation**, 44, 257–266, 2004.
- MIZUTANI, J. Selected allelochemicals. **Critical Review Plant Science**. 18: p.653–71, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.
- MUSACCHI, S. Aspetti biochimici della disaffinità d’innesto. Dipartimento di Colture Arboree - Università di Bologna. **Rivista di Frutticoltura**, Bolonha, n.3, p.73-79, 1994.
- NICKELL, L.G. Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. **Hawaii Plant Research**, v.57, p.223-229, 1964.
- OMOKOLO N.D., KANMEGNE G. Changes in phenol content and peroxidase activity during *in vitro* organogenesis in *Xanthosoma sagittifolium* L. **Plant Growth Regulation**, v.40 p.53–57, 2003.
- ÖZTÜRK, L.; DEMIR, Y. Effects of Putrescine and Ethephon on Some Oxidative Stress Enzyme Activities and Proline Content in Salt Stressed Spinach Leaves. **Plant Growth Regulation**, v.40, p.89-95, 2003.
- ÖZTÜRK, L.; DEMIR, Y. *In Vivo* and *In Vitro* Protective Role of Proline. **Plant Growth Regulation**, v.38, p.259-264, 2002.
- OZYIGIT, I.I., M.V. KAHRAMAN AND O. ERCAN. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **African Journal. of Biotechnology**, 6(1): p.003-008, 2007.
- PASTERNAK, T.P. et al. The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. **Plant Physiology**, v.129, p.1807-1819, 2002.

- PATEL, K.R.; THORPE, T.A. Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 13: p.219-228, 1988.
- PATHAK, S. et al. Effect of growth regulators on in vitro multiplication and rooting of shoot cultures in sugarcane. **Sugartech**. v.1 p.86-88, 2009.
- PEREIRA, J. E. S., FORTES, G. L. R. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n.9, p. 1035-1043, (2003).
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN., 1977, 289p.
- PRUSKI, K., T. ASTATKIE, AND J. NOWAK. Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking cherry (*Prunus tomentosa*) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 82(2): p.207-211, 2005.
- PUTTER, J. Peroxidases. In: **Methods of Enzymatic Analysis**. (Berbmeyer, H.U.). New York, Academic Press, 2^a ed., v.2;, 1974, p.688.
- RAMANAND, M.; LAL, S.B.; SINGH, V.P. Optimization of rooting in micropropagated shoots of sugar cane **Sugartech**, v.9, p.95-97, 2007.
- RICE, E.L. **Allelopathy**. Orlando, FL: Academic Press; 1984.
- RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Boletim Técnico de Lançamento de novas variedades RB de Cana-de-Açúcar**. Recife, Imprensa Universitária da UFRPE, 2005,(28p.).
- RODRIGUEZ, R. et al. *In vitro* mass propagation of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) var. Isd 32 troughed shoots tips and folded leaves culture. **Biotechnology** v. 6 p. 588-592, 2008.
- S.A.; RASHID, H. et al. A. Rapid micropropagation of three elite Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 7, pp. 2174-2180, 2008.
- SAHER, S.et al. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.120, p.152-161, 2004.
- SAMPAIO, E. V. S. et al. Capacidade de suprimento de nitrogênio e resposta à fertilização de vinte solos de Pernambuco. Campinas, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. V.19 p.269-279, 1995.
- SANTOS, C.C.C.; RODRIGUES, P.H.V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar *pacovan*. **Bragantia**, Campinas, v.63, n.2, p.201-205, 2004.
- SHARIFIAN, S. et al. Assessment of phloroglucinol effect on rooting of tissue cultured persian walnut. **Acta Horticulturae**, p.189-195, 2009.
- SINGH, B.; YADAV, G. C.; LAL, M. An efficient protocol for micropropagation of sugarcane using shoot tip explants. **SugarTech**, 3(3). 113-116, 2001.

SINGH, H.P. et al. Caffeic acid inhibits in vitro rooting in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] hypocotyls by inducing oxidative stress. **Plant Growth Regulation**, p.1-10, 2008.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. SYMPOSIA OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, CAMBRIDGE, v. 11, p. 118-131, 1957.

SOOD, N. P. K. et al. Comparative studies on field performance of micropropagated and conventionally propagated sugarcane plants. **Plant Tissue Culture Biotechnology**, v. 16 p.25-29, 2006.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

SREENIVASULU, N. et al. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet differential salt tolerance. **Plant Science**, v.141, p.1-9, 1999.

SVALHEIM O. & ROBERTSEN B. Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. **Physiology Plant**, 78: 261–267, 1990.

SYROS, T. et al. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **J. Plant Physiology**, 161, 69–77, 2004.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. UFRGS, 1ed, 2005.

THIMANN, K.V; SKOOG, F. On the inhibition of bud development and other functions of growth substance in *Vicia faba* Proceedings of the Royal Society of London Series B. **Biological Science**, London, v. 144 p. 317-339, 1934.

THIPYAPONG P, HUNT M, STEFFENS J. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. **Phytochemistry**, v.40, p.673–676, 1995.

THORPE, T.A.; MEYER, D.D. Starch metabolism in shoot forming tobacco callus. **Journal Experiment Botany**, v.25, p. 288-294, 1974.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUFO, J.A. **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília, Embrapa. v.1 p. 183-185, 1998.

TROBEC, M. et al. Fluctuations of different endogenous phenolic compounds and cinnamic acid in the first days of the rooting process of cherry rootstock ‘GiSela 5’ leafy cuttings. **Plant Physiology**, Ed. 162 p. 589-597, 2005.

UNICA/União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. (2008) Acessado em 20 de maio de 2008 Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/portalunica/?Secao=referencia>.

WEBBER, D.G.G. **Influência do número de subcultivos na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de plantas micropropagadas de morangueiro**. 2004. p. 91. Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Passo Fundo - RS.

WILSON, P.J., VAN STADEN, J. Rhizocaline, rooting cofactors and the concept of promoters and inhibitors of adventitious rooting – a review. **Annals of Botany**, 66: p.479-490, 1990.

WOODWARD, A.W; BARTEL, B. Auxin: Regulation, Action and Interaction. **Annals of Botany**, V. 95 p. 707-735, 2005.

WORLD SUGAR STATISTICS. Kent, UK: F.O. **Lichts & Agra Information Limited**; 2005.

WU, H.C. et al. The phenolic 3,4-dihydroxybenzoic acid, is an endogenous regulator of rooting in *Protea cynaroides* **Plant Growth Regulation**, 52: p.207–215, 2007.

ZANOL, G. C. et al. Uso do ácido indolbutírico e do escuro no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’. **Ciência Rural**, v. 28, p. 387-391, 1998.

ZIMMERMAN, W.; WILCOXON, F. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. **Contrib. Boyce Thompson Inst.** v.7: p.209-217, 1935.

6. ANEXOS

PLANT CELL CULTURE & MICROPROPAGATION

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS E COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

(Revisado 10/04/08)

A revista “**Plant Cell Culture & Micropropagation**” é editada semestralmente pela Editora da Universidade Federal de Lavras (Editora UFLA), publica artigos científicos e comunicações científicas da área de cultura de tecidos de plantas, elaborados por membros da comunidade científica nacional e internacional. Não é cobrada taxa para publicação de trabalhos, desde que um dos autores seja sócio e esteja em dia com a ABCTP (Associação de Cultura de Cultura de Tecidos de Plantas). É condição fundamental que os artigos/comunicações submetidos à apreciação da revista “**Plant Cell Culture & Micropropagation**” não foram e nem serão publicados simultaneamente em outro lugar. Com a aceitação do artigo para publicação, os editores adquirem amplos e exclusivos direitos sobre o artigo para todas as línguas e países. A publicação de artigos/comunicações dependerá da observância das Normas Editoriais, dos pareceres do Corpo Editorial e da Comissão *ad hoc*. Todos os pareceres têm caráter sigiloso e imparcial, e tanto os autores quanto os membros do Corpo Editorial e/ou Comissão *ad hoc* não obtêm informações identificadoras entre si.

Os conceitos e afirmações contidos nos artigos e comunicações serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

1. SUBMISSÃO:

Cada trabalho deverá ter no **máximo 14 páginas** e junto do mesmo deverá ser encaminhado ofício dirigido ao Editor Chefe da revista, solicitando a publicação do artigo.

Esse ofício deverá conter o pedido de apreciação na revista ao editor chefe, a declaração de ser um trabalho original e não ter sido submetido a nenhuma outra revista, ser **assinado por todos os autores**, constar o endereço completo, telefone e e-mail de todos. Qualquer inclusão, exclusão ou alteração na ordem dos autores, deverá ser notificada mediante ofício assinado por todos os autores (inclusive do autor excluído).

Originais: quatro vias impressas em e uma via em CDR, com texto e ilustrações e gráficos. Das 4 vias impressas apenas 1 deve conter os nomes completos dos autores e rodapé na primeira página.

Processador de texto: Word for Windows (version 98, 2000, XP ou 2003)

Redigido em português, inglês ou espanhol

Espaçamento do texto: Duplo. Margens: esquerda (3cm), direita (2cm), inferior e superiores (2,5cm). Cabeçalho e Rodapé (2,5cm).

Papel: formato A4

Fonte: Times New Roman, tamanho 12

Número de páginas: até 14 páginas, numeradas consecutivamente, incluindo as ilustrações

Tabelas: devem fazer parte do corpo do artigo e ser apresentadas no módulo tabela do Word. O título deve ficar acima.

Gráficos, Figuras e Fotografias: devem ser apresentados em preto e branco, nítidos e com contraste, escaneados, inseridos no texto após a citação dos mesmos e também em um arquivo à parte, salvos em

extensão “tif” ou “jpg”, com resolução de 300 dpi. Os gráficos devem vir também em excel, com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas.** em arquivo à parte. **Símbolos e Fórmulas Químicas:** deverão ser feitos em processador que possibilite a formatação para o programa Page Maker, sem perda de suas formas originais.

2. ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO

2.1. O artigo científico deve ser apresentado na seguinte seqüência:

TÍTULO

Suficientemente claro, conciso e completo, evitando-se palavras supérfluas, em letras maiúsculas, centralizado, em negrito, em português e inglês.

AUTORES

Máximo de 6 autores

Nomes completos sem abreviação, com chamada para nota de rodapé da primeira página em apenas 1 das 4 vias do manuscrito

Rodapé deve conter: titulação – instituição a que o autor está filiado – endereço da instituição – CEP – cidade, estado – endereço de e-mail, do respectivo autor.

RESUMO

Deve condensar, em um único parágrafo, o conteúdo, expondo objetivos, materiais e métodos, os principais resultados e conclusões em não mais do que 250 palavras. De acordo com as normas da NBR6028

Termos para indexação : no mínimo de três e máximo de cinco. Não devem repetir os termos que se acham no título, podem ser constituídas de expressões curtas e não só de palavras e devem ser separadas por vírgula. Se possível, extraídas do vocabulário: Thesagro – Thesaurus Agrícola Nacional, desenvolvido pela CENAGRI (indicação da revista “**Plant Cell Culture & Micropropagation**” para evitar o uso de vários sinônimos como termos de indexação)

ABSTRACT

Além de seguir as recomendações do resumo, não ultrapassando 250 palavras, deve ser uma tradução próxima do resumo.

Index terms: representam a tradução das palavras-chave para a língua inglesa.

INTRODUÇÃO

Deve apresentar uma visão concisa do estado atual do conhecimento sobre o assunto, que o manuscrito aborda e enfatizar a relevância do estudo, sem constituir-se em extensa revisão e, na parte final, os objetivos da pesquisa. Deve incluir a revisão de literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção pode ser dividida em subtítulos, indicados em negrito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Podem ser divididas em subseções, com subtítulos concisos e descritivos, e conter tabelas e figuras.

CONCLUSÕES

Finalizar com os resultados de acordo com os objetivos do trabalho

AGRADECIMENTOS

Se for o caso ao fim do texto, e antes das Referências Bibliográficas, a pessoas ou instituições. O estilo, também aqui, deve ser sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais se fazem os agradecimentos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Devem seguir as normas para citação no texto e na seção própria.

2.2. A comunicação científica deve ser apresentada na seguinte seqüência:

TÍTULO

Suficientemente claro, conciso e completo, evitando-se palavras supérfluas, em letras maiúsculas, centralizado, em negrito, em português e inglês.

AUTORES

Máximo de 6 autores

Nomes completos sem abreviação, com chamada para nota de rodapé da primeira página em apenas 1 das 4 vias do manuscrito

Rodapé deve conter: titulação – instituição a que o autor está filiado – endereço da instituição – CEP – cidade, estado – endereço de e-mail, do respectivo autor.

RESUMO

Deve condensar, em um único parágrafo, o conteúdo, expondo objetivos, materiais e métodos, os principais resultados e conclusões em não mais do que 250 palavras. De acordo com as normas da NBR6028

Termos para indexação : no mínimo de três e máximo de cinco. Não devem repetir os termos que se acham no título, podem ser constituídas de expressões curtas e não só de palavras e devem ser separadas por vírgula. Se possível, extraídas do vocabulário: Thesagro – Thesaurus Agrícola Nacional, desenvolvido pela CENAGRI (indicação da revista “**Plant Cell Culture & Micropropagation**” para evitar o uso de vários sinônimos como termos de indexação)

ABSTRACT

Além de seguir as recomendações do resumo, não ultrapassando 250 palavras, deve ser uma tradução próxima do resumo.

Index terms: representam a tradução das palavras-chave para a língua inglesa.

Texto: sem subdivisão, porém com introdução, material e métodos, resultados e discussão (podendo conter tabelas e gráficos e conclusão subentendidas.

AGRADECIMENTOS

Se for o caso ao fim do texto, e antes das Referências Bibliográficas, a pessoas ou instituições. O estilo, também aqui, deve ser sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais se fazem os agradecimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Devem seguir as normas para citação no texto e na seção própria.

3. CASO O ARTIGO CONTENHA FOTOGRAFIAS, GRÁFICOS, FIGURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS, ESSAS DEVERÃO OBEDECER ÀS SEGUINTE NORMAS:

3.1 **Fotografias** deverão ser apresentadas em **preto e branco**, nítidas e com contraste, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte, **salvas em extensão “TIFF” ou “JPEG” com resolução de 300 dpi.**

3.2 **Figuras** deverão ser apresentadas em **preto e branco**, nítidas e com contraste, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte, **salvas em extensão “TIFF” ou “JPEG” com resolução de 300 dpi**. As figuras deverão ser elaboradas com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas**.

3.3 **Gráficos** deverão ser inseridos após citação dos mesmos, dentro do próprio texto, elaborado preferencialmente em Excel, com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas**.

3.4 **Símbolos e Fórmulas Químicas** deverão ser feitas em processador que possibilite a formatação para o programa **Page Maker** (ex: MathType, Equation), sem perda de suas formas originais.

OBS: A formatação correta é parte imprescindível para que o trabalho seja devidamente protocolado. Caso este não esteja nas normas, o mesmo será recusado.

4. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:** as referências bibliográficas devem ser citadas conforme a NBR6023/2002 da ABNT.

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo.

4.1. Orientações gerais:

- Deve-se apresentar todos os autores do documento científico (fonte);
- O nome do periódico deve ser descrito por extenso, não deve ser abreviado;
- Em todas as referências deve-se apresentar o local de publicação (cidade), a ser descrito no lugar adequado para cada tipo de documento;
- As referências devem ser ordenadas alfabeticamente.

4.2. Exemplificação (tipos mais comuns):

ARTIGO DE PERIÓDICO:

VIEIRA, R. F.; RESENDE, M. A. V. de. Épocas de plantio de ervilha em Patos de Minas, Uberaba e Janaúba, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 74-80, jan./mar. 2000.

LIVRO:

a) livro no todo:

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill Book, 1960. 481 p.

b) Parte de livro com autoria específica:

FLEURY, J. A. Análise ao nível de empresa dos impactos da automação sobre a organização da produção de trabalho. In: SOARES, R. M. S. M. **Gestão da empresa**. Brasília: IPEA/IPLAN, 1980. p. 149-159.

c) Parte de livro sem autoria específica:

MARTIM, L. C. T. Nutrição de bovino de corte em confinamento. In: _____. **Confinamento de bovino de corte**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1986. cap. 3, p. 29-89.

DISSERTAÇÃO E TESE:

GONÇALVES, R. A. **Preservação da qualidade tecnológica de trigo (*Triticum aestivum* L.) e controle de *Rhizopertha dominica* (F.) durante o armazenamento em atmosfera controlada com Co₂ e N₂**. 1997. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

MATIOLI, G. P. **Influência do leite proveniente de vacas mastíticas no rendimento de queijo fresco**. 2000. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

Nota: “A folha é composta de duas páginas: anverso e verso. Alguns trabalhos, como teses e dissertações são impressos apenas no anverso e, neste caso, indica-se f.” (ABNT, NBR6023/2002, p. 18).

TRABALHOS DE CONGRESSO E OUTROS EVENTOS:

SILVA, J. N. M. Possibilidades de produção sustentada de madeira em floresta densa de terra firme da Amazônia brasileira. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão: SBS/SBEF, 1990. p. 39-45.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS:

As obras consultadas *online* são referenciadas conforme normas específicas para cada tipo de documento (monografia no todo e em parte, trabalho apresentado em evento, artigo de periódico, artigo de jornal, etc.), **acrescidas de informações sobre o endereço eletrônico apresentado entre braquetes (< >), precedido da expressão “Disponível em:” e da data de acesso ao documento, precedida da expressão “Acesso em:”**.

Nota: “Não se recomenda referenciar material eletrônico de curta duração nas redes” (ABNT, NBR6023/2000, p. 4). Segundo padrões internacionais, a divisão de endereço eletrônico, no fim da linha, deve ocorrer sempre após barra (/).

Monografia (acesso online):

a) livro no todo

TAKAHASHI, T. (Coord.). **Tecnologia em foco**. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. 90 p. Disponível em: <<http://www.socinfo.org.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

b) parte de livro

TAKAHASHI, T. Mercado, trabalho e oportunidades. In: _____. **Sociedade da informação no Brasil**: livro verde. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. cap. 2, p. 13-24. Disponível em: <<http://www.socinfo.gov.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

c) Parte de congresso, seminário, etc.

GIESBRECHT, H. O. Avaliação de desempenho de institutos de pesquisa tecnológica: a experiência de projeto excelência na pesquisa tecnológica. In: CONGRESSO ABIPTI, 2000, Fortaleza. **Gestão de institutos de pesquisa tecnológica**. Fortaleza: Nutec, 2000. Disponível em: <<http://www.abipti.org.br>>. Acesso em: 01 dez. 2000.

d) Tese

SILVA, E. M. **Arbitrariedade do signo**: a língua brasileira de sinais (LIBRAS). 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Linguística Aplicada e Estudo de Língua) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 1997. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/virtualbooks/freebook/port/did/teses.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2000.

Artigo de periódico (acesso online):

RESENDE, A. M. G. Hipertexto: tramas e trilhas de um conceito contemporâneo. **Informação e Sociedade**, Recife, v. 10, n. 1, 2000. Seção Educação. Disponível em: <<http://www.informacoesociedade.ufpb.br/>>. Acesso em: 30 nov. 2000.

CITAÇÃO: PELO SISTEMA ALFABÉTICO (AUTOR-DATA) (conforme ABNT, NBR10520/2002)

Dois autores - Steel & Torrie (1960) ou (STEEL & TORRIE, 1960).

Três ou mais autores - Valle et al. (1945) ou (VALLE et al., 1945).

Obs.: Quando forem citados dois autores de uma mesma obra deve-se separá-los pelo sinal & (comercial).

5. O EDITOR CHEFE NOTIFICARÁ O AUTOR DO RECEBIMENTO DO ORIGINAL E, POSTERIORMENTE, O INFORMARÁ SOBRE SUA PUBLICAÇÃO. OS ARTIGOS QUE NECESSITAREM DE MODIFICAÇÕES SERÃO DEVOLVIDOS AO AUTOR PARA A DEVIDA REVISÃO.

6. OS ARTIGOS NÃO APROVADOS SERÃO DEVOLVIDOS.

7. OS ARTIGOS SERÃO PUBLICADOS EM ORDEM DE APROVAÇÃO.

8. O NÃO-CUMPRIMENTO DESSAS NORMAS IMPLICARÁ NA DEVOLUÇÃO DO ARTIGO AO AUTOR.

9. OS CASOS OMISSOS SERÃO RESOLVIDOS PELA COMISSÃO EDITORIAL.

10. O ARTIGO DEVERÁ SER ENVIADO PARA:

Plant Cell Culture & Micropropagation
Universidade Federal de Lavras
Depto. de Biologia - Setor de Fisiologia Vegetal
Caixa Postal: 3037
37200-000 – Lavras – MG – BRAZIL

- [Objetivos e política editorial](#)
- [Instruções gerais](#)
- [Custo para publicação](#)

ISSN 0103-9016 *versão
impressa*

ISSN 1678-992X *versão
online*

Objetivos e política editorial

Scientia Agricola é uma publicação da Universidade de São Paulo / Campus "Luiz de Queiroz" - Piracicaba, e tem por objetivo publicar artigos originais que contribuam para o desenvolvimento científico das Ciências Agrárias e Ambientais.

Possui um espectro amplo, abrangendo Produção Vegetal, Produção Animal, Melhoramento Genético, Engenharia Rural, Entomologia, Fitopatologia, Ciência e Tecnologia de Alimentos e Nutrição, Ciências Florestais, Ciências Ambientais e do Solo e Ciências Básicas aplicadas à Agricultura

Os artigos submetidos à revista devem ser inéditos, sendo vedada sua apresentação simultânea em outra revista. Podem também ser submetidos Notas Prévias, Pontos de Vista e Cartas ao Editor. A reprodução de artigos é permitida, desde que citada a fonte.

Instruções gerais

Originais: uma via e um CD com texto e ilustrações

Língua: Inglês

Processador de texto: Word for Windows

Espaçamento do texto: duplo, margens laterais de três centímetros

Papel: formato A4, com linhas numeradas

Fonte: Times New Roman, tamanho 12

Número de páginas: até 30 páginas, numeradas consecutivamente, incluindo as ilustrações

Apresentação da página de rosto

- a. título do artigo (máximo de 15 palavras)
- b. nome(s) do(s) autor(es), indicar com asterisco o autor correspondente

- c. filiação científica do(s) autor(es), mencionando Instituição/Departamento/Seção
- d. e-mail do autor correspondente

Apresentação da estrutura do artigo

Não colocar nomes dos autores.

- a. Título em inglês, abstract (no máximo 250 palavras) e key words (máximo de cinco)
- b. Título, Resumo e Palavras-chave
- c. Introdução (contendo revisão de literatura) máximo 25 linhas
- d. Material e Métodos
- e. Resultados e Discussão
- f. Conclusões (opcional)
- g. Agradecimentos
- h. Referências Bibliográficas
- i. O Título, Resumo e Palavras-chave deverão também ser feitos em português

Citações do texto

- a. as citações de autores no texto são em letras minúsculas, seguidas do ano de publicação
- b. no caso de dois autores, usar & ("e" comercial)
- c. havendo mais de dois autores, é citado apenas o sobrenome do primeiro, seguido de et al. (não itálico)
- d. Não serão aceitas citações de comunicações pessoais e artigos no prelo.

Referências bibliográficas

As referências são normalizadas segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (NBR 6023). Devem ser apresentadas em:

- ordem alfabética pelo sobrenome do autor
- dois ou mais autores, separar por (;)
- os títulos dos periódicos não devem ser abreviados

Artigos de periódicos

WULFF, N.A.; PASCHOLATTI, S.F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**, v.55, p.138-143, 1998.

Publicados online

ALMEIDA, F.T.; BERNARDO, S.; SOUSA, E.F.; MARTINS, S.L.D.; GRIPPA, S. Growth and yield of papaya under irrigation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, p.419-424, 2003. Available at:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=>

sci_issuetoc&pid=0103-901620030003&lng=pt&nrm=iso.
Accessed 04 Sept. 2003.

Livros

PINDYC, R.S.; RUBINFELD, D.L. **Econometric models and economic forecasts**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1991. 596p.

Capítulos de livros

FRIED, W.M.; WARNER, J.R. Organization and expression of eukaryotic ribosomal protein genes.
In: STEIN, G.S.; STEIN, J.L., (Ed.) **Recombinant DNA and cell proliferation**. Orlando: Academic Press, 1984. cap.1, p.169-192.

Eventos (considerados em parte)

CHANDRA, S. Tropical crop statistic: a world perspective.
In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, 6., Lima, 1983.
Proceedings. Lima: International Potato Center, 1984. p.41-46.

Teses e Dissertações

ZUCCHI, R.A. Taxonomia de espécie de *Trichogramma* (*Hym. Trichogrammatidae*) associada a algumas pragas (Lepidoptera) no Brasil. Piracicaba: USP/ESALQ, 1985. 77p. (Livre-Docência).

Citação de resumo

DAHM, H. Metabolic activity of bacteria isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestres* L.). **Acta Microbiologica Polonica**, v.33, n. 2, p.157-162, 1984. / Resumo 294 em **Soils and Fertilizers**, v.48, p.33, 1985/.

Tabelas e figuras

Tabelas: Numeradas com algarismos arábicos, devem ser apresentadas no módulo tabela do MS Word ou MS Excel. O título deve ficar acima.

Figuras/Gráficos: Numeradas com algarismos arábicos, devem ser apresentadas em MS Excel. O título deve ficar abaixo.

Fotografias: Devem ser fornecidas no formato tif (300DPI) e também no formato original em papel fotográfico. Fotografias aparecerão como figuras no formato final do artigo e seguirão a numeração das figuras.

Informações Complementares

- A nomenclatura científica deve ser citada segundo os critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais em cada área.
- Unidades e Medidas devem seguir o Sistema Internacional.
- Os conceitos e opiniões contidos nos artigos são de exclusiva responsabilidade dos autores.

Encaminhamento de artigos

Na carta de encaminhamento do manuscrito deverão constar a assinatura, o CPF e o endereço eletrônico de todos os autores, mais o endereço postal e telefone do autor correspondente.

Encaminhar para USP / ESALQ / SCIENTIA AGRICOLA,
Prof. Luís Reynaldo F. Alleoni - Editor Chefe

Custo para publicação

Se o primeiro autor e/ou o autor correspondente for assinante:

R\$ 23,00 por página impressa no formato final, até 6^a páginas
R\$ 75,00 por página adicional

Se o primeiro autor e/ou o autor correspondente não for assinante:

R\$ 46,00 por página impressa no formato final, até 6^a páginas
R\$ 150,00 por página adicional

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)

© 2009 Scientia Agricola

Av. Pádua Dias, 11
Caixa Postal 9
13418-900 Piracicaba SP Brasil
Tel.: +55 19 3429-4401 / 3429-4486
Fax: +55 19 3429-4401
scientia@esalq.usp.br