

GILVANY RODRIGUES DE ANDRADE

Resposta do sistema antioxidativo sob a influência de 6-benzilaminopurina
na micropropagação de cana-de-açúcar.

Recife
Fevereiro, 2011

GILVANY RODRIGUES DE ANDRADE

Resposta do sistema antioxidativo sob a influência de 6-benzilaminopurina
na micropropagação de cana-de-açúcar.

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

ORIENTADORA: Dra. TEREZINHA RANGEL CAMARA

Recife
Fevereiro, 2011

Ficha catalográfica

A553r Andrade, Gilvany Rodrigues de
Resposta do sistema antioxidativo sob a influência de
6-benzilaminopunina na micropropagação de cana-de-açúcar /
Gilvany Rodrigues de Andrade – 2011.
75 f. : il.

Orientadora: Terezinha Rangel Camara
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco. Departamento de Química, Recife, 2011.
Inclui referências e anexo.

1. 6-benzilaminopunina 2. Biorreator de imersão temporária
3. Cana-de-açúcar 4. Enzimas antioxidativas 5. Massa verde
I. Camara, Terezinha Rangel, orientadora II. Título

CDD 631.53

GILVANY RODRIGUES DE ANDRADE

Resposta do sistema antioxidativo sob a influência de 6-benzilaminopurina
na micropropagação de cana-de-açúcar.

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 17/02/2011

ORIENTADORA: _____

DSc. Terezinha Rangel Camara
Professora do Departamento de Química – UFRPE

EXAMINADORES:

DSc. Lilia Gomes Willadino
Professora do Departamento de Biologia – UFRPE

DSc. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Professora do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-UFRPE

DSc. Cláudia Ulisses
Professora do Departamento de Biologia-UFRPE

Recife – Fevereiro de 201

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

Albert Einstein

*Aos meus pais, pelo amor que nos une,
por toda dedicação e apoio na minha formação.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado força em todos os momentos da minha caminhada.

Aos meus pais, Ivan Manoel de Andrade e Gilza Rodrigues de Andrade, pelo constante apoio, compreensão e pelo imenso carinho dedicado.

À Profa. Dra Terezinha Rangel Camara pela imensa dedicação, paciência, interesse, orientação e compreensão, decisiva em todos os aspectos.

À Profa. Dra. Lilia Willadino, por ter me dado o “empurrão inicial” durante a graduação e me dado a oportunidade para minha entrada nesse “mundo científico”.

À Profa. Cláudia Ulisses, pela amizade e apoio neste trabalho.

Ao meu noivo Gileno Vitor pela ajuda e compreensão em todos os momentos que precisei.

A Francisco Wellington pela paciência, amizade, ensinamentos e auxílios preciosos para a conclusão do experimento.

A Ana Amâncio pelas valiosas informações e ajuda durante todo o curso, além da sua amizade.

Aos meus colegas do laboratório Gemima (amiga de longa data), Luciana, Ronaldo, Laís, Arquimedes, Marciana, Silvany, João, Fernando, Natália, Karine, Emmanuel e Marta por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável.

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

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Agradeço a CAPES/REUNI, pela concessão da bolsa de estudos durante este curso.

Agradeço também a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para o bom andamento desse trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CAPÍTULO I	01
1. INTRODUÇÃO GERAL	02
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1 Aspectos históricos, botânicos e socioeconômicos da cana-de-açúcar.....	05
2.2 Cultura de tecidos vegetais.....	07
2.2.1. Morfogênese <i>in vitro</i>	11
2.2.2. Reguladores de crescimento e multiplicação <i>in vitro</i>	13
2.2.3. Cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar	15
2.3 Estresse oxidativo: Espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidativo	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO II	33
Resposta do sistema antioxidativo sob a influência de 6-benzilaminopurina na micropropagação de cana-de-açúcar.....	34
ABSTRACT	35
RESUMO.....	36
INTRODUÇÃO	37
MATERIAIS E MÉTODOS	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
AGRADECIMENTOS	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
CONCLUSÕES GERAIS	68
ANEXO	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos tratamentos de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar cv RB 872552 em meio líquido em sistema estático com ou sem adição de BAP.

Tabela 2. Atividade da peroxidase (POD), catalase (CAT), polifenoloxidase (PPO) e peroxidase do ascorbato (APX) expressas em U/mg em massas verdes e plantas de cana-de-açúcar variedade RB872552 aos 20 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com ou sem BAP, na parte aérea (pa) e nas raízes (rz).

Tabela 3. Teor de fenóis totais expresso mg/g de matéria fresca da em massas verdes (M) e plantas (P) da variedade de cana-de-açúcar RB 872552 aos 20 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com e sem BAP.

Tabela 4. Teor da glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona total expressas em nmol/g de matéria fresca em plantas (P) e massas verdes (M) da variedade RB 872552 de cana-de-açúcar aos 20 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com ou sem BAP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto de massas verdes formadas durante a micropropagação em biorreatores de imersão temporária.

Figura 2. Número de perfilhos da variedade de cana-de-açúcar RB 872552 cultivada em meio MS sem ou com BAP. (PcBAP: plantas do BIT com BAP que permaneceram no meio estático com BAP; PsBAP: plantas do BIT com BAP que se encontravam no meio estático sem BAP; PssBAP: plantas do BIT ausente de BAP que permaneceram no meio estático sem BAP). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 3. Número de perfilhos por faixas de comprimento: 1-4cm, 5-8cm e 9-12cm em cana-de-açúcar variedade RB 872552. (PcBAP: plantas do BIT com BAP que permaneceram no meio estático com BAP; PsBAP: plantas do BIT com BAP que se encontravam no meio estático sem BAP; PssBAP: plantas do BIT ausente de BAP que permaneceram no meio estático sem BAP). Cada barra representa a média o desvio padrão.

Figura 4. Comprimento médio de massas verdes de cana-de-açúcar variedade RB 872552. (MsBAP: massa verde sem contato com BAP; McBAP: massa verde em contato com BAP). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 5. Foto de massas verdes de cana-de-açúcar variedade RB 872552. (MsBAP: massa verde sem contato com BAP; McBAP: massa verde em contato com BAP).

Figura 6. Presença de raiz nos tratamentos (PssBAP e PsBAP) e ausência de raiz tratamento (PcBAP) em plantas de cana-de-açúcar variedade RB 872552. (PcBAP: plantas do BIT com BAP que permaneceram no meio estático com BAP; PsBAP: plantas do BIT com BAP que se encontravam no meio estático sem BAP; PssBAP: plantas do BIT ausente de BAP que permaneceram no meio estático sem BAP).

Figura 7. Foto ilustrativa da presença de raiz no tratamento (MsBAP) e ausência de raiz tratamento (McBAP) em massas verdes de cana-de-açúcar variedade RB 872552. (MsBAP: massa verde sem contato com BAP; McBAP: massa verde em contato com BAP).

Figura 8. Foto ilustrativa da flutuação do comportamento de massas verdes de cana-de-açúcar variedade RB 872552. Da esq. → dir.: Alongamento das estruturas em roseta aos 20 dias de tratamento em meio sem BAP (MsBAP). Continuação das formações de massa verde no tratamento em meio com BAP (McBAP) e oxidação no meio de cultura.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BAP - 6-benzilaminopurina

KIN - Cinetina

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

O₂^{•-} - Superóxido

HO[•] - Radical hidroxila

¹O₂ - oxigênio singlete

Fe²⁺ - Ferro

Cu²⁺ - Cobre

APX (EC 1.11.1.11) - Peroxidase do ascorbato

CAT (EC 1.11.1.6) - Catalase

PPO (EC 1.14.18.1) - Polifenoloxidase

POD (EC 1.11.1.7) - Peroxidase

mM - Milimolar

AsA - Ascorbato

μM - Micromolar

BIT - Bioreator de Imersão Temporária

BITs - Bioreatores de Imersão Temporária

CaOCl - Hipoclorito de cálcio

MS - Meio de cultura basal

pH - Potencial hidrogênio iônico

PVP - Polivinilpirrolidona

GHS - Glutathiona reduzida

GSSG - Glutathiona oxidada

nm – Nanômetro

PcBAP- Plantas do BIT com BAP que permaneceram no meio estático com BAP

PsBAP-: Plantas do BIT com BAP que se encontravam no meio estático sem BAP

PssBAP- Plantas do BIT ausente de BAP que permaneceram no meio estático sem BAP

McBAP- Massa verde em contato com BAP

MsBAP- Massa verde sem contato com BAP

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) estende-se a regiões tropicais e subtropicais de mais de 80 países, sendo o Brasil seu maior produtor. Este agronegócio assume papel relevante no cenário socioeconômico nacional e mundial, fornecendo matéria-prima para as agroindústrias do açúcar, álcool e aguardente, além de representar uma importante fonte de geração de empregos e renda no setor industrial e rural (CIB, 2010).

Em decorrência da posição de destaque que ocupa na economia mundial, a cultura da cana-de-açúcar está freqüentemente inserida em programas de melhoramento, visando à introdução de características de interesse agrônômico, como resistência a pragas e patógenos, tolerância a herbicidas e aumento no teor de sacarose. Nos programas de melhoramento da cana-de-açúcar, a transformação genética é uma importante ferramenta para a obtenção de variedades agronomicamente superiores. Para a transformação genética, é essencial o desenvolvimento de protocolos eficientes de cultivo *in vitro*, tanto para o processo de transformação propriamente dito, como para a obtenção e multiplicação de mudas transformadas (DESAI et al., 2004).

A micropropagação é uma alternativa ao processo convencional de propagação vegetativa da cana-de-açúcar por meio de colmos. Altas taxas de multiplicação podem ser alcançadas por esse método que reúne as vantagens da produção de mudas *in vitro* com alto padrão fitossanitário e fisiológico, em curto prazo e reduzido espaço físico (HENDRE, 1983; TORRES et al., 1998; PEREIRA & FORTES, 2003; ALI et al., 2008).

O sucesso para o cultivo *in vitro* de plantas depende de fatores como: genótipo; tipo, idade e tamanho dos explantes; composição do meio de cultura; tipos e dosagens de reguladores de crescimento vegetais adicionados ao meio e condições de cultivo. Os reguladores de crescimento vegetais, substâncias sintéticas que produzem efeitos semelhantes aos dos fitormônios, têm se destacado como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (THORPE, 1994; MOREIRA-DIAS et al., 2001; SILVA et al., 2005). Segundo George & Sherrington (1984), a morfogênese *in vitro* é regulada pela interação e balanço entre os reguladores de crescimento acrescentados ao meio de cultura, principalmente citocininas e auxinas.

As citocininas são uma das principais classes de reguladores de crescimento usados na micropropagação. Caracterizam-se por promoverem a quebra da dominância apical, aumentando a taxa de multiplicação por meio de brotações laterais relacionadas à atividade promovida nos meristemas. O tipo e a concentração de citocinina estão entre os fatores que mais influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro*. A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP - N-(fenilmetil)-7H-purina-6-amina) tem se mostrado muito eficaz em promover a multiplicação em diversas espécies, seguida da cinetina (KIN - N⁶-furfuriladenina), que também é empregada em muitos experimentos de cultura de tecidos de plantas (TOMBOLATO & COSTA, 1998). Concentrações elevadas de citocininas podem incrementar a ação da citocinina-oxidase, impedir a atuação da citocinina sobre a divisão celular e, conseqüentemente, a indução de brotações (SOUZA et al. 1995). Existem registros de fitotoxicidade do BAP em diferentes espécies de plantas (BAIRU et al. 2007, 2008, 2009).

Anormalidades anatômicas e ultraestruturais, alterações metabólicas, nanismo, teratologia, albinismo e hiperidricidade têm sido descritas em vários sistemas de cultivo

in vitro como decorrentes da exposição excessiva a citocininas (RAMAGE & WILLIAMS, 2004), bem como a formação de touceiras caracterizadas por uma superbrotção e encurtamento dos brotos em cana-de-açúcar durante o processo de micropropagação, a essa formação dá-se o nome de massa verde.

Essas anomalias morfofisiológicas e metabólicas de plantas, células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro* acarretam ausência ou perda da capacidade morfogênica e podem ser ocasionados por estresse oxidativo, induzido por diversos fatores incluindo a super exposição a reguladores de crescimento *in vitro* (CASSELLS & CURY, 2001; GASPAR et al.,2002).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a hipótese de que a ocorrência de massa verde é resultante da exposição prolongada ou excessiva ao BAP, analisando o status redox do material vegetal que apresenta essa desordem fisiológica.

2. REVISÃO DE LITERATURA / FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS, SÓCIO-ECONÔMICOS E BOTÂNICOS DA CANA-DE-AÇÚCAR.

As primeiras notícias sobre a existência da cana-de-açúcar encontram-se anotadas nas escrituras mitológicas dos hindus e nas Sagradas Escrituras. Até o século XVIII foi considerada como remédio e mesmo artigo de luxo. Apareceu primeiramente nas ilhas do Arquipélago da Polinésia. As caravelas, antes de iniciarem suas viagens, levavam mudas de cana-de-açúcar junto às suas provisões, para serem plantadas em novas terras e servirem de suprimentos às novas expedições. Foi assim que ocorreu a introdução da cana-de-açúcar nas Américas através da segunda expedição de Cristóvão Colombo, em 1493 (CESNIK, 2004).

As primeiras mudas de cana-de-açúcar chegaram ao Brasil por volta de 1515, vindas da Ilha da Madeira (Portugal), tendo sido o primeiro engenho de açúcar construído em 1532, na capitania de São Vicente. Mas foi no Nordeste, especialmente nas capitanias de Pernambuco e da Bahia, que os engenhos de açúcar se multiplicaram. Historicamente, a cana-de-açúcar sempre foi um dos principais produtos agrícolas do Brasil, e hoje, o país tem novamente a primeira posição no ranking mundial (CIB, 2010).

O Brasil é hoje o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com aproximadamente 665 milhões de toneladas na safra 2010/2011, em uma área de 8,1 milhões de hectares, o que representa apenas 2,3% da área agrícola do país (CONAB, 2010). Os bons números e o aprimoramento tecnológico permitem que o país seja também o maior exportador mundial de açúcar, respondendo sozinho por 45% de todo o

produto comercializado no mundo. Na fabricação de etanol, que utiliza aproximadamente 1% da área agricultável do país e 57% da área plantada com cana-de-açúcar, o Brasil divide com os EUA o papel de maior produtor mundial, onde juntos, os países são responsáveis por 70% de todo o etanol produzido no planeta (CIB, 2010).

A região Nordeste ocupa a segunda posição no ranking da produção nacional com mais de 64 milhões de toneladas, respondendo a aproximadamente 12% da produção nacional. Pernambuco apresenta uma produção superior a 19 milhões de toneladas de cana-de-açúcar destinada à indústria sucroalcooleira, sendo classificado como o segundo maior produtor do Nordeste (CONAB, 2010).

De acordo com Matsuoka (1996), em meados do século passado, os canaviais do mundo todo passaram a apresentar graves problemas fitossanitários, com elevadas perdas de produção e, com isso, muitas indústrias foram à falência. Em virtude desse fato, e do conhecimento das leis da genética aliada à descoberta de que a cana-de-açúcar produzia sementes, começaram os esforços para o melhoramento genético da cultura. Atualmente, os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar são desenvolvidos em diferentes países, por instituições públicas e privadas, ou em sistemas cooperativos formados por produtores (CESNIK, 2004). No Brasil, os programas de melhoramento genético foram criados inicialmente por produtores curiosos, no início do século passado. Em 1972 foi criado o Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR), o qual após sua extinção em 1990, passou a ser conduzido pelas Universidades Federais que compõe a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA). Atualmente a RIDESA é composta por dez Universidades Federais (UFRPE, UFAL, UFRJ, UFPR, UFV, UFS,

UFPI, UFG, UFMT, UFscar). Essas instituições são responsáveis pelas variedades de cana-de-açúcar com a sigla RB (República do Brasil) (RIDESA, 2011).

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 do tipo 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).

A variedade RB 872552 é recomendada para plantios de verão com colheita no final da safra e apresenta como características agroindustriais: maturação precoce, teor alto de sacarose e médio de fibras, bom perfilhamento e fechamento entrelinhas, com alta produtividade agrícola e industrial e, como consequência, elevada produção de açúcar por área. Seus destaques são a produtividade e adaptabilidade (RIDESA, 2005).

2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Há mais de 100 anos, Haberlandt elaborou o conceito de cultura de tecidos vegetais e forneceu as bases para o cultivo de células vegetais, tecidos e órgãos de plantas. Inicialmente a cultura de tecidos vegetais surgiu como uma ferramenta de pesquisa e centrou-se sobre as tentativas de cultivar e estudar o desenvolvimento de células isoladas e segmentos de tecidos vegetais. A cultura de tecidos envolve, portanto,

um conjunto de técnicas mediante as quais um explante (parte isolada de uma planta, como protoplastos, células, tecidos e órgãos) é cultivado de forma asséptica em um meio nutritivo, sob condições controladas de temperatura e luminosidade (SOUZA et al., 2006).

Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, em vista da totipotência, ou seja a capacidade do tecido ou células de gerar órgãos e outras estruturas da planta. Na prática, entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático, ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Sob condições *in vitro* e em função da composição química do meio nutritivo, é possível manter indefinidamente a proliferação de calos ou o cultivo de células em suspensão, iniciar a formação de brotos e raízes ou promover a embriogênese somática. Todas essas possibilidades têm aplicação prática na biotecnologia: culturas de células indiferenciadas e culturas de raiz podem ser usadas na produção de metabólitos secundários com valor comercial, enquanto a capacidade de formação de brotos é usada em tecnologias de micropropagação de genótipos valiosos (híbridos, material sanitizado ou espécies vegetais raras) (EZHOVA, 2003).

Em meados do século XX, a noção de que as plantas poderiam ser regeneradas ou multiplicadas a partir de calos ou da cultura de órgãos foi amplamente aceita e se seguiu a aplicação prática na indústria de propagação de plantas. A técnica foi anunciada como o sistema universal de propagação clonal em massa de plantas para o futuro e o termo "micropropagação" foi introduzido para descrever com mais precisão o processo (AKIN-IDOWU et al., 2009). Um maior impulso foi dado nos anos 70, com

crecente interesse, tanto na aplicação em nível comercial como para auxiliar programas de melhoramento genético (GYVES, 1994). No ano de 1980 muitos laboratórios comerciais foram estabelecidos ao redor do mundo para aproveitar o potencial da micropropagação para produção clonal de plantas em larga escala para o setor de horticultura (AKIN-IDOWU et al., 2009).

Esta técnica viabiliza a clonagem de várias espécies, permitindo a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta matriz. É um procedimento de importância prática e potencial na agricultura, com especial enfoque na produção de mudas em larga escala, no intercâmbio de germoplasma, bem como na pesquisa básica, principalmente em citologia e fisiologia celular. O uso da micropropagação tem se destacado para a cultura de cana-de-açúcar, principalmente, no lançamento de novas variedades, promovendo para os agricultores maior rapidez ao acesso às novas cultivares desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético (SOUZA et al., 2006).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), o processo de micropropagação divide-se em três estágios: No estágio I, realiza-se a seleção de explantes e a desinfestação total do mesmo seguido da cultura em meio nutritivo sob condições assépticas. Esta etapa apresenta uma grande dificuldade quanto à obtenção de tecidos descontaminados sem conduzi-los à morte, quando isolados. São determinantes os pré-tratamentos aplicados na planta matriz para o sucesso dessa etapa do trabalho, principalmente no que se refere aos microrganismos endógenos. No estágio II, promove-se a multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação. Embora o objetivo desta fase seja produzir o maior

número de plantas possível, no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos devem ser considerados. Não basta conseguir altas taxas de multiplicação em alguns explantes. O importante é obter uma taxa média satisfatória com o mínimo de variação de explante para explante. Outro aspecto essencial é a qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois isto vai determinar o sucesso na fase de enraizamento. No estágio III, ocorre a transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato ou solo, processo este também chamado de aclimatização.

A metodologia tradicional de micropropagação fundamenta-se em cultivos em pequenos frascos, com número reduzido de plantas por frasco, e uso de meio nutritivo gelificado, o que acarreta intensa manipulação das culturas. Sistemas automatizados de imersão temporária surgiram na década de noventa e ampliaram a capacidade de produção de plantas micropropagadas permitindo a automação do processo e a redução de custos (LORENZO et al., 1998, 2001; LAKSHMANAN, 2006).

Os biorreatores podem ser conceituados como equipamentos para cultivo sob imersão temporária ou permanente de células, gemas, embriões ou qualquer tipo de propágulo que possa ser utilizado na micropropagação. O meio de cultura líquido, utilizado nesse sistema permite a renovação do ar durante o cultivo, bem como o monitoramento de alguns parâmetros essenciais ao crescimento do propágulo, tais como pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de íons, etc; bem como a prevenção de distúrbios fisiológicos dos brotos e a hiperidricidade (TEIXEIRA, 2002). Os primeiros biorreatores derivaram de equipamentos denominados fermentadores, os quais foram, há muitas décadas, desenvolvidos para cultivo de fungos e bactérias para

fins industriais. Assim, os primeiros biorreatores testados para plantas continuaram sendo chamados de fermentadores, por serem utilizados basicamente para o cultivo de células vegetais isoladas, de forma muito parecida com o que era feito com os fungos e bactérias. Inicialmente, os fermentadores foram empregados com pouca ou nenhuma modificação para o cultivo de células vegetais. Para isso, pequenos ajustes foram feitos na taxa de renovação do ar e nas formas de agitação das células (TAKAYAMA & AKITA, 1994).

O primeiro relato sobre o uso de biorreatores para propagação vegetal foi primeiramente feito por Takayama e Misawa (1981) para micropropagação de begônia.

Os sistemas de cultivo em biorreatores de imersão podem ser divididos em permanentes ou temporários. No sistema permanente, os explantes ficam sempre em contato com o meio de cultura, enquanto no sistema temporário, o material vegetal entra em contato com o meio de cultura de tempos em tempos, de acordo com programação predefinida (ALVARD et al., 1993). Este método fundamenta-se no princípio de que as plantas se desenvolvem melhor e mais rapidamente quando cultivadas em intervalos regulares de imersão em meio líquido seguido de drenagem. O maior contato das plantas com o meio de cultura aumenta consideravelmente, a sua absorção, uma vez que os nutrientes podem ser absorvidos pelas folhas, caules e raízes. Em tese, as plantas absorvem mais nutrientes no sistema de imersão do que no tradicional e, conseqüentemente, produzem mais biomassa (TEIXEIRA, 2002).

2.2.1. MORFOGÊNESE *IN VITRO*

Morfogênese *in vitro* é o processo de surgimento de órgãos ou estruturas vegetais a partir de células ou tecidos que originalmente não possuem essa forma ou

estrutura (COOPER, 2001). Processos morfogênicos incluem o crescimento, divisão e diferenciação das células, que dependem basicamente, da atividade e expressão de determinados genes que são regulados por diversos fatores endógenos e exógenos (EZHOVA, 2003). Entre os fatores endógenos o genético incorpora o estoque de potencialidades que podem ser expressas durante o desenvolvimento e um segundo fator está representado pelas características originadas durante a ontogênese. Finalmente, existem as características cuja expressão depende apenas do ambiente (KERBAUY, 1999).

O processo de desenvolvimento de uma nova planta pode ocorrer via organogênese ou embriogênese somática. A organogênese é o processo de formação de uma nova planta a partir de um explante mediante a formação de órgãos (parte aérea e raízes), enquanto que na embriogênese somática ocorre a formação de embriões a partir de células não zigóticas. Ambas as rotas podem ocorrer sem ou com a formação de calos, caracterizando a via direta ou indireta, respectivamente. Na via morfogênica direta, seja organogênica ou embriogênica, os órgãos ou embriões somáticos surgem a partir de meristemas pré-existentes nos tecidos do explante, enquanto que pela via indireta ocorre primeiro a formação de calos, seguindo-se a formação de meristemoides e finalmente, plantas ou embriões (ANDRADE, 2002). Os calos, formados na via morfogênica indireta, são definidos como um “grupo ou massa de células com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação” (TORRES et al., 2000).

O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de fatores, tais como: o genótipo, o tipo, a idade e o tamanho dos explantes, a composição dos meios de

cultura, as condições de cultivo e os tipos e as dosagens de reguladores de crescimento adicionados ao meio, os quais se têm destacado como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (THORPE, 1994; MOREIRA-DIAS et al., 2001; SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2008).

A produtividade (número de plantas produzidas por unidade de cultura) de brotos de cultivares de cana-de-açúcar em sistema de imersão temporária mostrou-se dependente da frequência de imersão, tamanho do explante e genótipo (MORDOCCO et al., 2009). Ali et al. (2008), trabalhando com micropropagação de dois genótipos de cana-de-açúcar (CP 77 400 e BL 4) também constataram a influência genotípica na morfogênese *in vitro* em resposta a diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

2.2.2. REGULADORES DE CRESCIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

Reguladores de crescimento são substâncias químicas que têm efeito sobre o metabolismo vegetal (LAMAS, 2001). Adicionados ao meio de cultura, em concentrações específicas, desempenham um papel fundamental no crescimento e morfogênese em cultura de tecidos de plantas (PIERIK, 1990; FLORES et al., 1998). A adição de reguladores de crescimento na fase de estabelecimento *in vitro* tem como principal objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta-matriz (SILVA et al., 2006).

Já foi demonstrado que as citocininas são capazes de regular a expressão dos genes STM (relacionado com a formação do meristema apical durante a embriogênese e manutenção do meristema apical e meristema floral na fase pós-embriônico) e KNAT1

(envolvido na manutenção do estado meristemático das células) e isto explica porque as citocininas aumentam a capacidade de formação de brotos *in vitro* e *in vivo*. A concentração e o tipo de citocinina determinam o potencial morfogênico dos explantes.

O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos fitormônios existentes no meio de cultura, principalmente citocininas e auxinas (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). As citocininas são indispensáveis na fase de multiplicação *in vitro*, pois são responsáveis pela quebra da dominância apical e indução da proliferação de gemas axilares (MOK et al., 2000). O tipo da citocinina e sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

A BAP (6-Benziloaminopurina) é a citocinina mais utilizada e vem se mostrando mais eficiente para promover a multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diferentes espécies de vegetais. A razão da sua eficiência pode estar relacionada à capacidade dos tecidos vegetais em metabolizarem reguladores de crescimento naturais mais rapidamente que os sintéticos (SOUZA & JUNGHANS, 2006).

Concentrações elevadas de citocininas podem aumentar a ação da citocinina-oxidase, impedindo a atuação da citocinina sobre a divisão celular e, conseqüentemente, a indução de brotações (BARRUETO CID, 2000). Alguns trabalhos apontam a fitotoxicidade do BAP em diferentes espécies de plantas (KUBALÁKOVÁ & STRNAD, 1992; BAIRU et al., 2007, 2008, 2009). Esta toxicidade é muitas vezes atribuída à natureza mais estável do BAP e seus metabólitos, tais como [9G] BAP nos tecidos vegetais *in vitro* e *ex vitro*, em comparação com outras citocininas.

O efeito tóxico caracteriza-se, principalmente, pelo baixo número de brotações, entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento do caule e vitrificação generalizada (BARRUETO CID, 2000; ALI et al., 2008; KHAN et al., 2008). Além do efeito sobre o aspecto das brotações, o excesso de citocinina pode resultar no surgimento de um número muito elevado de gemas adventícias o que pode ser indesejável do ponto de vista da integridade clonal (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). O efeito da citocinina não se restringe apenas ao subcultivo em que foi adicionada, sendo observado um efeito residual de uma transferência para outra, sendo este fenômeno conhecido por habituação. Acredita-se que a habituação seria mantida por um *feedback* positivo, na qual as citocininas induziriam a própria síntese ou inibiriam sua degradação (KERBAUY, 1999). Esse efeito torna-se limitante na etapa de alongamento e enraizamento, sendo necessária uma fase intermediária de desintoxicação das culturas em meio com concentração reduzida ou em ausência da citocinina.

2.2.3. CULTIVO *IN VITRO* DE CANA-DE-AÇÚCAR

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 registraram a regeneração de plantas a partir de calos (NICKELL, 1964; BARBA & NICKELL, 1969; HEINZ & MEE, 1969). Para a cana-de-açúcar, a propagação *in vitro* é bastante vantajosa, considerando que um dos maiores problemas enfrentados em programas de melhoramento genético convencional nessa cultura é a dificuldade de multiplicar o material selecionado com rapidez. Normalmente, antes da utilização da

micropropagação, além dos 10 ou 15 anos de seleção, eram requeridos mais alguns anos para se estabelecer as novas cultivares em plantios comerciais (DONATO et al., 2005).

A micropropagação de cana-de-açúcar é bem documentada na literatura científica e atualmente sua clonagem comercial é realizada em biofábricas. Diferentes protocolos de micropropagação de cana-de-açúcar mostram a viabilidade desta técnica em meio semi-sólido (GARCIA et al., 2007), líquido estacionário e por imersão temporária (LORENZO et al., 2001; ARENCIBIA et al., 2008).

Na década de 90, o início da cultura de meristema em cana-de-açúcar, visava principalmente, a limpeza de variedades que se encontravam em declínio devido aos ataques de pragas tradicionais ou recém introduzidas além de problemas fitopatológicos. Na busca de obtenção de alta qualidade de matéria prima para a industrialização, e da necessidade de ganhos crescentes de produtividade para fazer frente aos frequentes choques na economia, a demanda técnica introduziu novos objetivos aos fundamentos do processo de cultura de tecidos: oferta ampla de material atualizado em relação às características agroindustriais requeridas pelo setor, adiantando-se na expansão de variedades potencialmente promissoras e possibilidade de formação de um banco genético de mudas saudáveis, e geneticamente idênticas (CRUZ et al., 2009).

As novas plantas são regeneradas a partir de meristemas apicais e axilares e de tecidos de folhas imaturas (CESNIK & MIOCQUE, 2004; LEMOS, 2009). A micropropagação da cana-de-açúcar vem se desenvolvendo com sucesso e tem conseguido bastante aplicabilidade, facilitando a rápida multiplicação das novas variedades melhoradas e garantindo a produção de mudas livres de pragas e doenças, passíveis de transmissão pelos métodos tradicionais de propagação.

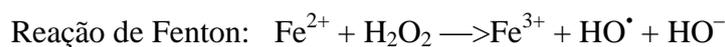
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO: ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SISTEMA ANTIOXIDATIVO

Há cerca de dois bilhões de anos atrás, o oxigênio molecular (O_2) foi introduzido em nossa atmosfera, a partir da evolução dos organismos fotossintetizantes (VINOCUR & ALTMAN, 2005).

O oxigênio na sua forma molecular 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 transportados ao longo da cadeia respiratória, gerando duas moléculas de água. No entanto, uma pequena parcela dos elétrons escapa da cadeia respiratória, resultando em uma redução parcial do oxigênio molecular, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na forma de oxigênio singlete (1O_2), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) (MITTLER, 2002). Essas moléculas tóxicas são formadas durante funções metabólicas normais nos peroxissomos, cloroplasto e mitocôndrias ou induzidas por estímulos ambientais aos quais as plantas estão constantemente expostas (MITTLER, 2002; EAUX, 2007).

As ROS são formadas em etapas de redução univalente a partir do oxigênio molecular. O primeiro passo na redução de O_2 produz radicais de vida relativamente curta, os superóxidos. Esses radicais de oxigênio 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). Posteriormente, a redução do oxigênio gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, 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 nessa reação é o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$). 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 hidroxil apresenta uma meia-vida muito curta, pois reage muito rapidamente com moléculas biológicas, seqüestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio (BREUSEGEM et al., 2001; NORDBERG & ARNER, 2001).



De acordo com Cassels & Cury (2001) o 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).

Os organismos estão metabolicamente preparados para eliminar quantidades controladas dessas espécies, mas em condições de estresse há aumento da produção intracelular de ROS, pelo que os mecanismos normais de defesa não são suficientes para eliminá-los, e dessa forma anular o seu efeito adverso (MARTINS & MOURATO, 2008). Nessas condições, há formação de ROS em excesso, que tem efeitos nocivos para as plantas, podendo causar a oxidação de vários componentes celulares e mesmo levar à destruição oxidativa da célula (DAT et al., 2000, HAMMOND-KOSACK, 1996; MOLLER et al., 2007). O aumento da produção de ROS em condições de estresse

ambiental pode provocar danos nas células, resultantes da destruição oxidativa de vários componentes celulares.

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 e acredita-se que podem ser ocasionados por estresse oxidativo induzido por diversos fatores incluindo a super exposição à reguladores de crescimento *in vitro* (CASSELLS & CURY, 2001; GASPAR et al., 2002).

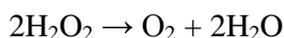
O papel das ROS em condições de estresse abiótico tem sido foco de investigação nos últimos anos, na medida em que estes têm vindo a ser relacionados com mecanismos de aclimação ao estresse. Pensa-se que as ROS atuem como sinalizadores que induzem a ativação de mecanismos de defesa e de resposta ao estresse (DAT et al. 2000). Neste sentido, as ROS representam não só um indicador celular de condições de estresse, contribuem também para a transdução de sinal nos mecanismos de resposta ao estresse como mensageiros secundários, regulador de genes e mediador para ativação celular (MITTLER, 2002).

A função das ROS durante o crescimento e morfogênese vem sendo estudada, sugerindo que essas moléculas não são apenas simples sinalizadoras do estresse, mas apresentam também fundamental importância na sinalização do crescimento e desenvolvimento das plantas (OBERT et al., 2005; MERATAN et al., 2009). Essas espécies reativas induzem mudanças no padrão de expressão gênica, metabolismo celular e totipotência, que são importantes para a competência em células somáticas. Portanto, acredita-se que certo nível de estresse oxidativo é requerido para promover a

formação de células e desencadear uma rota morfogênica específica (BLAZQUEZ et al., 2009).

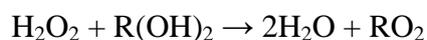
As plantas possuem um complexo sistema antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes (DEWIR *et al.*, 2006) capazes de prevenir o acúmulo de ROS e o estresse oxidativo (SAHER, *et al.*, 2004; DEWIR *et al.*, 2006; MARTINS & MOURATO, 2008). As enzimas do sistema antioxidante são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse. Destacam-se entre elas a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), polifenoloxidase (PPO, E.C. 1.14.18.1), peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) e peroxidase do ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11) (SOFO et al., 2005).

A catalase (CAT) é uma enzima tetramérica, com um grupo heme, presente nos peroxissomos, glioxissomos e outras organelas onde existam enzimas que gerem H₂O₂. (DAT et al., 2000). A sua atividade promove a eliminação de grandes quantidades de H₂O₂, ao catalisar a reação:



A catalase apresenta níveis catalíticos bastante elevados, o que sugere que a sua ação esteja relacionada com a eliminação de excesso de H₂O₂ acumulado em situações de estresse (MITTLER, 2002). No entanto, possui baixa afinidade para o substrato na medida em que são necessárias duas moléculas de H₂O₂ para o centro ativo da enzima (WILLEKENS et al., 1995). Além disso, a ausência de catalase nos cloroplastos não permite a proteção dos grupos SH de enzimas do ciclo de Calvin do efeito destrutivo do H₂O₂ (NOCTOR & FOYER 1998).

As peroxidases (POD) constituem uma via alternativa à catalase na remoção de H_2O_2 , uma vez que possuem maior afinidade para o substrato (NOCTOR & FOYER, 1998) e que estão presentes em quase todos os compartimentos celulares (JIMÉNEZ et al., 1997), sendo portanto mais eficientes na remoção do H_2O_2 . A sua ação é dependente de um substrato como agente redutor para a conversão do H_2O_2 a H_2O e O_2 , de acordo com a reação genérica, em que $R(OH)_2$ representa o substrato redutor utilizado e RO_2 representa a forma oxidada desse substrato.



As peroxidases variam consoante o substrato redutor que é utilizado. Assim, a POD utiliza preferencialmente fenóis aromáticos, como o guaiacol, e a ascorbato-peroxidase (APX) utiliza como agente redutor o ascorbato (AsA), sendo esta última considerada uns dos mais eficazes mecanismos de remoção do H_2O_2 . A POD e a APX possuem mecanismos de peroxidação semelhantes, diferindo no substrato redutor utilizado, embora a POD possa também oxidar o ascorbato, mas a taxas muito inferiores ao guaiacol (ASADA, 1999), enquanto a APX possui alta afinidade para o ascorbato, sendo considerada muito específica para este substrato (MEHLHORN et al., 1995). Mittler (2002) sugere que a APX poderá ser responsável pelo controle dos níveis de ROS para efeitos de sinalização molecular, uma vez que permite o controle de pequenas quantidades de H_2O_2 , na ordem dos μM , e em localizações mais específicas do que a CAT, como referido anteriormente.

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 atividade das enzimas responsáveis pela oxidação fenólica podem contribuir como indicadores de estresse.

A glutathiona é um tripeptídeo que possui radical sulfidrila na sua estrutura e se apresenta na forma reduzida de tiol (GSH) e na oxidada (GSSG), na qual dois tripeptídeos são ligados por uma ponte dissulfeto (BERG et al., 2004). A glutathiona é amplamente utilizada como marcador de estresse oxidativo para diversos organismos, dentre eles os vegetais (GRILL et al., 2002). Atualmente, se discute a possibilidade de utilizá-la como um modelo universal redox e de sinalização no nível celular (NOCTOR et al., 2002).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIN-IDOWU, P. E.; IBITOYE, D. O.; ADEMOYEGUN, O.T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, v.8 (16), p. 3782-3788, 2009.

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.

ALVARD, D.; COTE, F. & TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tiss.and Org. Cult.** v.32, p.55-60, 1993.

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

ARENCIBIA, A.D., BERNAL, A., YANG, L., CORTEGAZA, L., CARMONA, E.R., PERE C-J., LI, Y-R., ZAYAS, C.M. & SANTANA, I. New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). **J.Plant Sci.** 2008.

ASADA, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v.50 p.601–639, 1999.

BAIRU, M.W.; JAIN, N.; STIRK, W.A.; DOLEZAL,K.; STADEN, J.V. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. **South African Journal of Botany**, v.75,n.1,p.122-127, 2009.

BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; DOLEZAL, K.; STADEN, J.V. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla* : can meta -topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.90,n.1, p.15-23, 2007.

BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; STADEN, J.V. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars ‘Williams’ and ‘Grand Naine’ (*Musa* spp. AAA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, V.95,N.3, P.373-379, 2008.

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

BARRUETO CID, L.P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). Introdução aos hormônios vegetais. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 55-88, 2000.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER L. **Bioquímica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BLAZQUEZ, S.; OLMOS, E.; HERNÁNDEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ, J.A.; PIQUERAS, A. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.97, p.49-57, 2009.

BORÉM, A.; VIEIRA, M.L.C. **Glossário de Biotecnologia**. Viçosa, Editora Universidade Federal de Viçosa, p.126, 2005.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVA, E.; DAT, J.F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P. DA; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004.

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.

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

CIB, Conselho de Informação sobre Biotecnologia. Guia da cana-de-açúcar. Disponível em: www.cib.org.br. Acesso em: 06 ago. 2010.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2010/2011, primeiro levantamento, abril/2010. 2010. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 06 ago. 2010.

COOPER, G.M. A célula: uma abordagem molecular. Porto Alegre: Armed Editora, p.712, 2001.

CRUZ, M.A.L.; SILVA, A.D.C.; VEIGA, C.F.M.; SILVEIRA, V. Biofábricas para produção de mudas por micropropagação: estratégia para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar no Rio de Janeiro. **Revista Científica Internacional**, n.2,v.5, p.21-38, 2009.

DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVÁ, E., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. & VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences** v.57, p.779–795, 2000.

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

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.

DONATO, V.M.S.; ANDRADE, A.G.; TAKAKI, G.M.C.; MARIANO, R.L.R.; MACIEL, G.A. Plantas de Cana-de-açúcar Cultivadas In Vitro com Antibióticos. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 29, n. 1, p. 134-141, 2005.

EAUX, B.; TOLEDANO, M.B. Ros as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p. 813 – 824, 2007.

EZHOVA, T.A. Genetic control of totipotency of plant cells in an in vitro culture. **Russian Journal of Developmental Biology**, 34 (4), 197–204, 2003.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H. et al. Regeneração in vitro de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.4, n.3, p.201-205, 1998.

GARCIA, R., CIDADE, D., CASTELLAR, A., LIPS, A., MAGIOLI, C., CALLADO, C. & E. In vitro morphogenesis patterns from shoot apices of sugar cane are determined by light and type of growth regulator. **Plant Cell, Tiss. Organ Cult.** 90:181-190. 2007.

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.

GASPAR, T. et al. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**, v,37, p.263-285, 2002.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. Plant propagation by tissue culture. **Eversley: Exegetics**, 1984.

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

GRILL, D.; TAUSZ, M.; DE KOK, L. J. Significance of glutathione to plant adaptation to the environment. **Hardcover**, 2002.

GYVES, E.M. Agrobiotecnologia. México: **Iberoamérica**, p.78, 1994.

HAMMOND-KOSACK, K. E. & JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell** v.8 p.1773–1791, 1996.

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.

JIMÉNEZ, A., HERNANDEZ, J. A., DEL RIO, L. A. & SEVILLA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology** v.114 p. 275–284, 1997.

KHAN, S.A. et al. Rapid micropropagation of three elite Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology** v.7 p. 2174-2180, 2008.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em culturas de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e**

transformação genética de plantas, Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, p.519-531, 1999.

KUBALAKOVA M. & STRNAD M. The effects of aromatic cytokinins on micropropagation and regeneration of sugar beet in vitro. **Biologia Plantarum Suppl.** v.34 p.578-579, 1992.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane – An addendum to the invited review sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v.42, n.3, p.201-205, 2006.

LAMAS, F. M. **Reguladores de Crescimento**. In: Embrapa Agropecuária Oeste. Algodão: tecnologia de produção. Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão, 296p, 2001.

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

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.

MARTINS, L. L. & MOURATO, M. P. Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. **Revista Agros** v.8, 2008.

MATSUOKA, S. Botânica e Ecofisiologia da cana-de-açúcar. Maringá: UFPR/SENAR, p.26, 1996.

MEHLHORN, H., LELANDAIS, M., KORTH, H.G. & FOYER, C.H. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. **FEBS Letters** v.378 p.203-206, 1995.

MERATAN, A.A.; GHAFARI, S.M.; NIKNAM, V. In vitro organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*. **Biologia Plantarum**, v.53, n.1, p.5-10, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

MOK, M.C.; MARTIN, R.C.; MOK, D.W.S. Cytokinins: biosynthesis metabolism and perception. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 36, n.2, p. 102-107, 2000.

MOLLER, I. M., JENSEN, P. E. & HANSSON, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology** v.58, p. 459-481, 2007.

MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, v.87, p.275-290, 2001.

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

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.

NOCTOR, G. & FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49 p.249-279,1998.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C. H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1283-1304, 2002.

OBERT, B.; BENSON, E.E.; MILLAM, S.; PRETOVÁ, A.; BREMNER, D.H. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax in vitro cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.537-547, 2005.

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.

PIERIK, R.L.M. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: **Ediciones Mudi-Prensa**, 326p, 1990.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Cytokinin-induced abnormal shoot organogenesis is associated with elevated Knotted1-type homeobox gene expression in tobacco. **Plant Cell Reports** (2004) v. 22 p.919–924, 2004.

RIDESA - Rede Interuniversitária 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), p.28, 2005.

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.

SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A. et al. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento in vitro de mirtilo (*vaccinium ashei* reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, pelotas, v. 12, n. 4, p. 405-408, 2006.

SILVA, R.P. da; COSTA, M.A.P. de C.; SOUZA, A. da S. ALMEIDA, W.A.B. de. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,v.40, p.1153-1159, 2005.

SILVA, R.P.R.; MENDES, B.M.J.; FILHO, F.A.A.M.Cultivo in vitro de gemas adventícias de laranja-azedada. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.10, p.1331-1337, 2008.

SOUZA, A.S.; COSTA, M.A.P.C.; SANTOS-SEREJO, J.A.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, F.V.D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p.11-35, 2006.

SOUZA, S.da S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de Plantas**. EMBRAPA, Cruz das Almas, BA, v.1, p. 79-96, 2006.

TAKAYAMA, S. & AKITA, M. The types of bioreactors used for shoots and embryos. **Plant Cell, Tissue and Org. Cult.** v. 39, p.147-156, 1994.

TEIXEIRA, J.B. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 24, 2002.

THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.17-36, 1994.

TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Boletim técnico n. 174. Campinas, Instituto Agronômico, 72p. 1998.

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.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUFO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília, Embrapa Hortaliças, p.128, 2000.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**. V.16 p.123-132, 2005.

WILLEKENS, H., INZÉ, D., VAN MONTAGU, M. & VAN CAMP, W. Catalase in plants. **Molecular Breeding** v.1 p.207-228, 1995.

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

CAPÍTULO II

RESPOSTA DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO SOB A INFLUÊNCIA DE 6-BENZILAMINOPURINA NA MICROPROPAGAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

**Resposta do sistema antioxidativo sob a influência de 6-benzilaminopurina na
micropropagação de cana-de-açúcar.**

Gilvany Rodrigues de Andrade^{1*}

Gemima Manço de Melo²

Terezinha Rangel Camara³

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Química, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife, PE - Brasil CEP: 52171-900, fone: (81) 3320-6364.

²UFRPE, Departamento de Agrônoma, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

³UFRPE, Departamento de Química, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

*Autor correspondente <gilvany07@gmail.com >

ABSTRACT

The occurrence of supersprouting in sugar cane, known as "green masses", was evaluated for the effect of BAP, correlating with the response of antioxidative system of plants and green masses. The plant material was derived from micropropagation in temporary immersion bioreactors (BIT) with BAP. Plants and green bodies were transferred to culture in static system in a liquid medium with or without BAP. Micropropagated plants in BIT without BAP remained without cytokinin, in static fluid system. Plants that remained with BAP (PcBAP) had increased tillering, but there was an inverse relationship to the size of the tiller. The presence of BAP inhibited the rooting of shoots and masses. In treatments with BAP in static system continued with the formation of green mass, proving that the culture system did not affect the occurrence of the anomaly, which was conditioned by prolonged exposure to BAP. The highest activity of POD was observed in roots and shoots of plants were in cultivation without BAP and had higher root formation, confirming the role of POD in the metabolism of indole acetic acid (IAA). The activity of catalase and ascorbate peroxidase were somewhat complementary, highlighting the need of joint antioxidant enzyme system. The activity of polyphenol oxidase in roots was higher in plants without BAP. In the green masses PPO activity was inversely proportional to total phenols. The phenolic content increased in shoots of plants grown with BAP and BAP in the masses without green (and PsBAP MsBAP), which coincides with rooting. There was no difference in total glutathione, but the plants that were not subject to the presence of BAP exhibited the highest ratio reduced glutathione / glutathione disulfide (GSH / GSSG).

Keywords: 6-benzylaminopurine, temporary immersion bioreactor, sugar cane, antioxidant enzymes, green mass.

RESUMO

A ocorrência de superbrotção em cana-de-açúcar, conhecida como “massas verdes”, foi avaliada quanto ao efeito do BAP, correlacionando com a resposta do sistema antioxidativo das plantas e massas verdes. O material vegetal foi proveniente da micropropagação em biorreatores de imersão temporária (BIT) com BAP. As plantas e massas verdes foram transferidas para cultivo em sistema estático em meio líquido com ou sem BAP. Plantas micropropagadas em BIT sem BAP permaneceram sem a citocinina, em sistema estático líquido. As plantas que permaneceram com BAP (PcBAP) apresentaram maior perfilhamento, mas observou-se uma relação inversamente proporcional ao tamanho dos perfilhos. A presença de BAP inibiu o enraizamento dos brotos e das massas. Nos tratamentos em sistema estático com BAP continuou havendo formação de massa verde, comprovando que o sistema de cultivo não interferiu na ocorrência da anomalia, que foi condicionada pela prolongada exposição ao BAP. A maior atividade da POD foi observada em raízes e parte aérea de plantas que estavam em cultivo sem BAP e apresentavam maior formação de raiz, confirmando o papel da POD no metabolismo do ácido indolacético (AIA). A atividade da catalase e da peroxidase do ascorbato foram de certa forma complementares, evidenciando a necessidade conjunta do sistema enzimático antioxidativo. A atividade de polifenoloxidase nas raízes foi maior nas plantas sem BAP. Nas massas verdes a atividade da PPO foi inversamente proporcional ao teor de fenóis totais. O teor de fenóis aumentou na parte aérea das plantas cultivadas com BAP e nas massas verdes sem BAP (PsBAP e MsBAP), coincidindo com o enraizamento. Não houve diferença quanto à glutatona total, mas as plantas que não foram submetidas à presença de BAP exibiram a mais alta relação glutatona reduzida/glutatona dissulfeto (GSH/GSSG).

Palavras-chave: 6-benzilaminopurina, biorreator de imersão temporária, cana-de-açúcar, enzimas antioxidativas, massa verde.

INTRODUÇÃO

O Brasil é hoje o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), com aproximadamente 665 milhões de toneladas na safra 2010/2011, em uma área de 8,1 milhões de hectares (CONAB, 2010).

A multiplicação desta espécie é normalmente realizada por meio de estacas. A adoção de técnicas de micropropagação é uma alternativa que possibilita a obtenção de mudas de variedades selecionadas, com alta qualidade fitossanitária em curto período de tempo (Aamir Ali et al., 2008).

A BAP (6-Benziloaminopurina) é a citocinina mais utilizada e vem se mostrando mais eficiente para promover a multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diferentes espécies de vegetais. A razão da sua eficiência pode estar relacionada à capacidade dos tecidos vegetais em metabolizarem reguladores de crescimento naturais mais rapidamente que os sintéticos (Souza and Junghans, 2006).

Concentrações elevadas de citocininas podem aumentar a ação da citocinina-oxidase, impedindo a atuação da citocinina sobre a divisão celular e, conseqüentemente, a indução de brotações (Barrueto cid, 2000).

No processo de micropropagação de plantas eventualmente ocorrem alterações morfofisiológicas que podem ser de natureza genética ou epigenética. Essas anomalias morfofisiológicas e metabólicas de plantas, células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro* acarretam ausência ou perda da capacidade morfogênica e podem ser ocasionados por estresse oxidativo induzido por diversos fatores incluindo a superexposição aos reguladores de crescimento *in vitro* (Cassells and Cury, 2001; Gaspar et al., 2002).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a hipótese de que a ocorrência de massa verde é resultante da exposição prolongada ou excessiva ao BAP, analisando o status redox do material vegetal que apresenta essa desordem fisiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

As plantas da variedade RB 872552 de cana-de-açúcar foram provenientes de embriogênese somática direta e micropropagadas em sistema de biorreator de imersão temporária (BIT) em meio basal MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), inositol ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP). Foram produzidas plantas e massas verdes, no processo de micropropagação em BIT. As massas verdes se caracterizam pelo aglomerado de um número excessivo de brotações de tamanho reduzido (Figura 1). A partir do surgimento dessas massas verdes, em cinco BITs o material vegetal passou a receber meio sem adição de BAP e outros cinco BITs continuaram recebendo o meio MS acrescido da citocinina.



Figura 1- Foto de massas verdes formadas durante a micropropagação em biorreatores de imersão temporária.

Plantas de cana-de-açúcar provenientes de embriogênese somática direta cultivadas em BITs em presença ou ausência de BAP e as massas verdes formadas durante a micropropagação em BITs com BAP foram utilizadas para a realização deste

experimento em sistema de cultivo em meio líquido estático. Com o objetivo de avaliar se a mudança de sistema de cultivo também poderia ser um fator de indução de massas verdes, foram estabelecidos os tratamentos descritos a seguir e sumarizados na Tabela 1.

As massa verdes formadas em BITs com BAP passaram a ser cultivadas em sistema estático em meio líquido com BAP ou sem BAP. Da mesma forma plantas provenientes do cultivo em BIT com BAP passaram a ser cultivadas no sistema estático com ou sem BAP enquanto que plantas que estavam em BIT sem BAP permaneceram sem a citocinina quando transferidas para o cultivo em meio líquido estático.

Tabela 1- Descrição dos tratamentos de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar cv RB 872552 em meio líquido em sistema estático com ou sem adição de BAP.

MATERIAL VEGETAL	TRATAMENTO	Procedência: MEIO de CULTURA em BIT	Destino: MEIO de CULTURA em SISTEMA ESTÁTICO
Massa verde	McBAP	MS c/BAP	MS c/BAP
	MsBAP		MS s/BAP
Planta	PcBAP	MS c/BAP	MS c/BAP
	PsBAP		MS s/BAP
	PssBAP	MS s/BAP	MS s/BAP

Foi utilizado o meio basal MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), inositol ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) nos tratamentos que receberam citocinina foi adicionado $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. O meio foi esterilizado pela adição de CaOCl (0,1% p/v) e o pH foi ajustado em 5,8.

As plantas e as massas verdes 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, onde permaneceram por 20 dias, período que corresponde a um subcultivo ou troca de meio em cultivo em BIT.

Os tratamentos em que se utilizaram as plantas foram mantidas 30 repetições. Cada repetição constou de um frasco de cultivo com quatro plantas de aproximadamente 5,0 cm de comprimento, totalizando 120 plantas por tratamento. Foram avaliados o número total de perfilhos, tamanho dos perfilhos, percentual de enraizamento e ocorrência de massa verde.

Os tratamentos em que se utilizaram as massas verdes em cada frasco foram incubados um aglomerado de massa verde com comprimento de aproximadamente 1,0 a 1,5 cm de altura. Os tratamentos constaram de 17 repetições. Foram avaliados o comprimento das massas verdes, presença de raiz e surgimento de novas massas verdes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. 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 (Silva, 2008).

Foram avaliados o comprimento das massas verdes e das plantas, presença de raiz e surgimento de novas massas verdes, em termos percentuais. As medidas de comprimento foram realizadas com régua milimetrada. Os dados foram tomados quantificando o número de perfilhos das plantas dentro de três faixas de comprimento: de 1,0-4,0 cm; de 5,0-8,0 cm; de 9-12 cm.

Foram coletadas amostras de tecido vegetal aos 20 dias de permanência nos respectivos tratamentos. Naqueles tratamentos em que se desenvolveram raízes foram coletadas amostras para análise.

Os materiais vegetais (planta /massa verde/ raiz) foram congelados em nitrogênio líquido e acondicionados em freezer a -20°C . Foram utilizados 0,5g de material vegetal que foram homogeneizados a frio em tampão fosfato e polivinilpirrolidona (PVP), centrifugado a $10.000g$ a 4°C . O sobrenadante foi utilizado para o preparo do extrato e as leituras foram feitas em espectrofotômetro. Foram adotadas as metodologias de Fatibello-Filho and Vieira (2002) para a determinação da atividade da peroxidase (POD), de Kar and Mishra (1976) para polifenoloxidase (PPO), de Berris and Sizer (1952) para catalase (CAT), de Nakano and Asada (1981) para peroxidase do ascorbato (APX), de Griffith (1980) para glutatona total, reduzida (GSH) e oxidada (GSSH), e de Bradford (1976) para os teores de proteína solúvel. Nas determinações de atividade enzimática foram usadas cinco repetições por tratamento.

O teor de fenóis totais foi determinado a partir de 0,3g de material vegetal fresco pelo método de Folin-Denis (Horwitz, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas cultivadas em BIT com BAP ($1,5 \text{ mg L}^{-1} = 6,66 \text{ } \mu\text{M}$) que foram transferidas para sistema estático também com BAP (PcBAP) apresentaram maior número de perfilhos (12,5 perfilhos/planta) diferenciando-se significativamente dos demais tratamentos (Figura 2). O tratamento no qual as plantas dos BITs com BAP foram transferidas para meio sem a citocinina (PsBAP) exibiu um número de perfilhos intermediário (6,75 perfilhos/planta), enquanto que o menor perfilhamento (1,94 perfilhos/planta) foi observado nas plantas que tinham estado sob cultivo em BIT sem citocinina e continuavam em meio sem BAP (PssBAP). Resultados similares foram constatados previamente por Vieira et al. (2009) na micropropagação das variedades de

cana-de-açúcar RB 867515 e RB 855156 cultivadas com diferentes concentrações de BAP e cinetina (KIN).

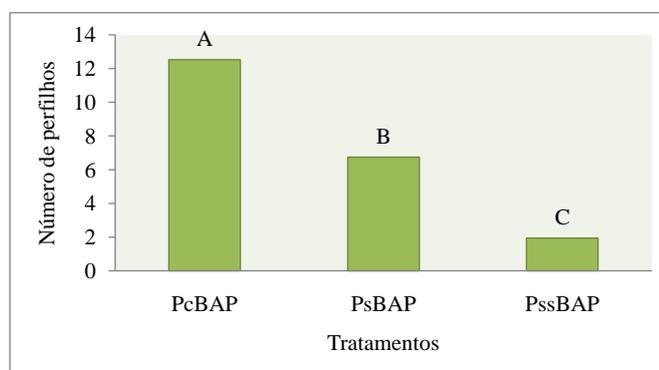


Figura 2. Número de perfilhos da variedade de cana-de-açúcar RB 872552 cultivada em meio MS sem ou com BAP. (PcBAP: plantas do BIT com BAP que permaneceram no meio estático com BAP; PsBAP: plantas do BIT com BAP que se encontravam no meio estático sem BAP; PssBAP: plantas do BIT ausente de BAP que permaneceram no meio estático sem BAP). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados demonstram a ação do BAP na quebra da dominância apical favorecendo a emissão de novos brotos (Mok et al., 2000; Grimaldi et al., 2008). O efeito benéfico do BAP na multiplicação de brotações relaciona-se com a influência deste regulador de crescimento na divisão celular e na liberação das gemas axiliares inibidas pela dominância apical (Preece, 1995). O BAP estimula o metabolismo de nitrogênio e conseqüentemente favorece o desenvolvimento das gemas, uma vez que influencia na produção endógena de AIA, de etileno e de outros reguladores de crescimento que estão diretamente envolvidos no crescimento e desenvolvimento de plantas (Salisbury and Ross, 1985). A capacidade de emissão de gemas pelas plantas que foram privadas da presença do BAP pode ser atribuída ao fato de que o efeito da citocinina não se restringe apenas ao subcultivo em que foi adicionada, sendo observado

um efeito residual de uma transferência para outra, fenômeno conhecido por habituação (Kerbaudy, 1999).

Maiores taxas de multiplicação (12,4 perfilhos/planta) foram relatadas por Behera and Sahoo (2009) na micropropagação de cana-de-açúcar da variedade Nayana, utilizando BAP ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) em conjunto com IBA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), e por Biradar et al. (2009) que registrou taxas de multiplicação de 19,91 perfilhos/planta na variedade COC-671 utilizando $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP durante 25 dias de cultivo.

Por outro lado, Aamir Ali et al. (2008), ao avaliarem o efeito das citocininas BAP e KIN nas variedades de cana-de-açúcar HSF-240 e CPF-237, aos 20 dias de cultivo, obtiveram média de 11 perfilhos/plantas utilizando $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN para o genótipo HSF-240, que não perfilhou em ausência de citocinina, enquanto que o genótipo CPF-237 apresentou taxa de multiplicação média de 0,5 perfilhos/planta quando sem citocinina.

Por conseguinte, associando as respostas do presente trabalho com os dados da literatura, constata-se que cada genótipo apresenta exigências e respostas diferentes às citocininas utilizadas, necessitando, portanto, a modificação na composição do meio de cultura conforme o genótipo a ser trabalhado (Aamir Ali et al., 2008; Radmann et al., 2009).

No que se refere ao tamanho dos perfilhos, observou-se uma relação inversamente proporcional a taxa de multiplicação, demonstrando que o aumento no número de brotações se dá em detrimento do crescimento delas. No tratamento PcBAP (que promoveu maior perfilhamento) predominaram perfilhos com comprimento nas faixas de 1,0-4,0 cm (9 perfilhos/planta) e 5,0-8,0 cm (2,65 perfilhos/planta) do que nos demais tratamentos, já na faixa de comprimento entre 9-12cm apresentou

aproximadamente 0,27 perfilhos/planta. As plantas do tratamento PsBAP, por outro lado, apresentaram uma quantidade superior de perfilhos com 9-12cm (0,63 perfilhos/planta) que os demais tratamentos nessa mesma faixa de comprimento. Porém na faixa de 1,0-4,0 cm obteve uma média de 4,05 perfilhos/planta e entre 5,0-8,0 cm (1,75 perfilhos/planta). No tratamento PssBAP, observou-se uma redução no número de brotações em relação a faixa de comprimento avaliado, obtendo número de perfilhos com comprimento nas faixas de 1,0-4,0 cm (1,54 perfilhos/planta), 5,0-8,0 cm (0,29 perfilhos/planta) e 9-12cm (0,06 perfilhos/planta) (Figura 3). Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Fraguás et al. (2009), que registraram uma relação inversa entre comprimento e número de brotações na multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro (*Ananas comosus L.*) da cultivar 'IAC Gomo-de-mel' utilizando $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Behera and Sahoo (2009) utilizando a mesma concentração de BAP ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) obteve comprimento médio de 3,7 cm em perfilhos de cana-de-açúcar variedade Nayana.

O efeito do BAP também foi avaliado em outras espécies vegetais confirmando sua ação na inibição da dominância apical e promoção da formação de gemas adventícias e desenvolvimento de brotações (Bassan and Bobrowski, 2003; Macêdo et al., 2003; Fráguas et al., 2004; Fráguas et al., 2009). Villa et al. (2010) trabalhando na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta (*Morus nigra L.*) verificou maior alongamento dos brotos (5,1 cm) em meio sem BAP em comparação com aqueles (1,1 cm) formados em meio com 1 mg L^{-1} de BAP. Estudos realizados anteriormente por Diniz et al. (2003) também demonstraram que a adição de BAP no meio de cultura causou redução no comprimento de brotações de macela (*Achyrocline satureioides (Lam.) DC.*)

O aumento da concentração de BAP no meio de cultura afetou negativamente o crescimento das brotações de morangueiro (*Fragaria vesca L.*) por induzir a sua proliferação (Brahm and Oliveira, 2004). O aumento exacerbado no número de brotações promove uma competição por sais e vitaminas presentes no meio de cultivo que pode acarretar em redução do crescimento (Oliveira et al., 2001).

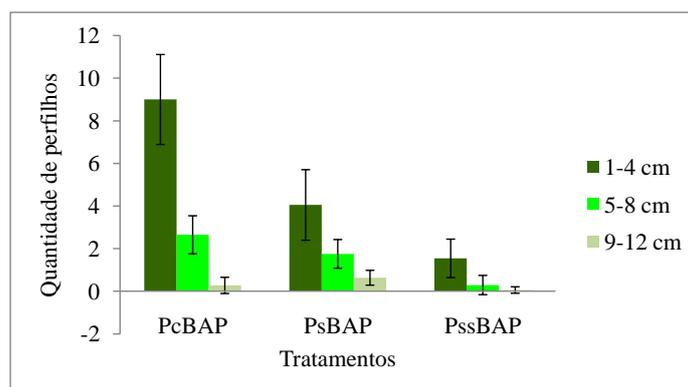


Figura 3. Número de perfilhos por faixas de comprimento: 1-4cm, 5-8cm e 9-12cm em cana-de-açúcar variedade RB 872552. (PcBAP:plantas do BIT com BAP que permaneceram no meio estático com BAP; PsBAP: plantas do BIT com BAP que se encontravam no meio estático sem BAP; PssBAP: plantas do BIT ausente de BAP que permaneceram no meio estático sem BAP). Cada barra representa a média o desvio padrão.

O cultivo das massas verdes em meio com citocinina (McBAP) inibiu o crescimento das brotações que apresentaram um comprimento médio de 1,3 cm, enquanto que no tratamento sem BAP (MsBAP) as massas verdes apresentaram um comprimento médio de aproximadamente 4,0 cm (Figuras 4 e 5).

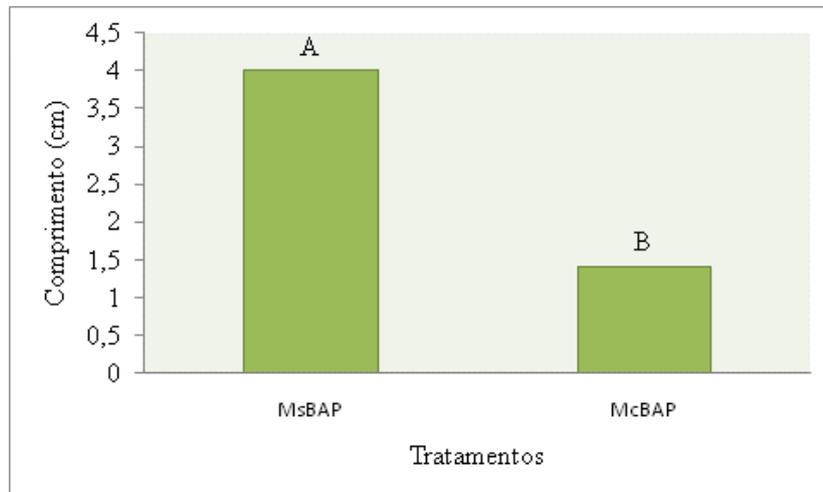


Figura 4. Comprimento médio de massas verdes de cana-de-açúcar variedade RB 872552. (MsBAP: massa verde sem contato com BAP; McBAP: massa verde em contato com BAP). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 5. Foto de massas verdes de cana-de-açúcar variedade RB 872552. (MsBAP: massa verde sem contato com BAP; McBAP: massa verde em contato com BAP).

De acordo com Grattapaglia and Machado (1990), o alongamento pode ser inibido pelo efeito acumulativo do regulador de crescimento presente no meio, no caso o BAP.

Ramage and Williams (2004), estudando anomalias em brotos de fumo suplementados com BAP ($40 \mu\text{M} \approx 9,0 \text{ mg L}^{-1}$) verificaram a redução no comprimento

dos brotos e deformidades nas folhas, também com formação de aglomerados do tipo touceira. Esse efeito foi proporcional a elevação na concentração de BAP.

Leshem et al. (1988) observaram que a citocinina é tóxica em níveis elevados, e seu efeito caracteriza-se principalmente pelo enrosetamento e falta de alongamento das culturas. Grattapaglia and Machado (1998), relatam que a tendência de diminuição do comprimento de brotações a partir de determinada concentração pode ser um efeito fitotóxico das citocininas.

Compreender a fisiologia por trás das anormalidades morfológicas que ocorrem na cultura de tecidos de plantas em presença de citocininas é difícil devido à grande variedade de efeitos que esses reguladores de crescimento provocam. Além dos efeitos sobre a divisão celular, as citocininas podem afetar diretamente a expressão gênica, a absorção e o padrão de distribuição dos minerais (Mengel and Kirkby, 2001), além das relações hídricas (Pospíšilová et al., 2000). Em cada caso, o desenvolvimento anormal de brotos na cultura de tecidos de plantas pode ser atribuída ao rompimento de um ou de todos estes processos (Ramage and Williams, 2004).

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, constatou-se que a transferência para o meio de cultura sem BAP reverteu à formação de massas verdes, ou seja, a formação de entouceiramento, e promoveu o crescimento das brotações formadas. Estes resultados corroboram com os de Grattapaglia and Machado (1998), os quais relatam que a transferência das culturas para meio básico, diluído ou não, com concentrações reduzidas ou sem citocinina, promove o crescimento das brotações, antes de individualizá-las para a fase de enraizamento. Esta reversão do efeito roseta da citocinina sobre a formação das brotações evidencia que a má formação era de natureza puramente fisiológica, não chegando a se caracterizar em habituação, situação em que

os tecidos vegetais desenvolvem um comportamento hormônio-autotrófico, muito freqüente em plantas submetidas ao suprimento exógeno de citocininas, e mantêm o estímulo do regulador de crescimento mesmo quando cultivado em ausência dele (Hewelt et al., 2000; Lin et al., 2007).

O enraizamento das plantas também foi afetado pelos tratamentos. As plantas que foram mantidas em meio com suprimento exógeno de BAP (PcBAP) não apresentavam raiz, enquanto que nos demais tratamentos (PsBAP e PssBAP) todas as plantas enraizaram (Figura 6). O mesmo ocorreu com a massa verde. A presença de BAP (McBAP) inibiu a formação de raiz e a supressão da citocinina (MsBAP) promoveu o enraizamento em todas as repetições (Figura 7).



Figura 6. Foto ilustrativa da presença de raiz nos tratamentos (PssBAP e PsBAP) e ausência de raiz no tratamento (PcBAP) em plantas de cana-de-açúcar variedade RB 872552. (PcBAP: plantas do BIT com BAP que permaneceram no meio estático com BAP; PsBAP: plantas do BIT com BAP que se encontravam no meio estático sem BAP; PssBAP: plantas do BIT ausente de BAP que permaneceram no meio estático sem BAP).

Resultados similares foram obtidos por Diniz et al. (2003), que observaram redução no número de brotos de macela enraizados, em meio com elevadas concentrações de BAP.

A inibição do enraizamento em decorrência da adição de citocininas ao meio já foi relatada na literatura para diferentes espécies (Souza and Pereira, 2007; Grimaldi et al., 2008). A rizogênese é geralmente inibida por altas concentrações de citocinina uma vez que essa classe de regulador de crescimento pode afetar negativamente o alongamento dos primórdios radiculares (Pasqual et al., 1998).



Figura 7. Foto ilustrativa da presença de raiz no tratamento (MsBAP) e ausência de raiz tratamento (McBAP) em massas verdes de cana-de-açúcar variedade RB 872552.(MsBAP: massa verde sem contato com BAP; McBAP: massa verde em contato com BAP).

Além da ausência de citocinina, outros fatores como o tamanho das partes aéreas e a produção endógena de auxina pelos brotos podem ter contribuído para o bom enraizamento *in vitro* dos tratamentos PsBAP, PssBAP e MsBAP. As partes aéreas são fontes de intensa produção auxínica que, ao ser translocada para a base da planta, estimula a rizogênese (Barcelo Coll et al., 1988).

A qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação determina, em geral, o sucesso do enraizamento.

A toxidez causada pelo excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura ou pelo prolongado período de tempo em que a cultura permanece exposta a

eles, pode provocar alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas, resultando no encurtamento dos caules, o que dificulta a individualização das plantas e o processo de enraizamento (Narayanaswamy, 1977).

No tratamento em que foi mantido o BAP no meio de cultura (PcBAP) aproximadamente 27% das plantas continuavam a produzir massa verde enquanto que nos tratamentos em que as plantas saíram do BIT com BAP (PsBAP) ou sem BAP (PssBAP) não mais tiveram contato com a citocinina não foi observado o surgimento das formações em roseta.

Os tratamentos em que as massas verdes foram mantidas em presença de BAP (McBAP) continuou a haver a formação dessas estruturas em roseta, além de ocorrer escurecimento do meio de cultura, resultante de oxidação fenólica. Nos tratamentos em que foi suprimido o BAP (MsBAP) cessou a formação de massa verde e houve reversão dessa má formação com o desenvolvimento de plantas a partir das rosetas (Figura 8).



Figura 8. Foto ilustrativa da flutuação do comportamento de massas verdes de cana-de-açúcar variedade RB 872552. Da esq. → dir.: Alongamento das estruturas em roseta aos 20 dias de tratamento em meio sem BAP (MsBAP). Continuação das formações de massa verde no tratamento em meio com BAP (McBAP) e oxidação no meio de cultura.

Ramage and Williams (2004), estudando anomalias em brotos de tabaco suplementados com citocininas (5-40 μ M de BAP) verificaram a continuidade do desenvolvimento de brotações em roseta em detrimento da diferenciação desses em brotos dos 14 aos 20 dias de cultivo, dificultando conseqüentemente, a percepção do número de brotos formados. Essa limitação também foi encontrada no decorrer deste experimento com a variedade RB 872552 de cana-de-açúcar.

Este fato deve-se, provavelmente, à interação entre as citocininas exógenas, utilizadas neste teste, com os níveis endógenos de reguladores de crescimento, principalmente de citocininas, já que as algumas plantas e as massas verdes utilizadas foram provenientes dos BITs suplementados com 1,5 mg L⁻¹ de BAP. Desta forma, a soma dos níveis endógenos com a concentração de citocininas presentes no meio de cultura pode ter provocado toxidez.

O excesso da citocinina ou o efeito residual desta decorrente de numerosos ciclos de multiplicação pode acarretar anomalias anatômicas e ultra-estruturais como também alterações no metabolismo, albinismo e brotos com aparência vitrificada. (Picoli et al., 2001). O efeito da citocinina não se restringe apenas ao subcultivo em que foi adicionada, sendo observado um efeito residual de uma transferência para outra. Esse efeito torna-se limitante na etapa de alongamento e enraizamento, sendo necessária uma fase intermediária de desintoxicação das culturas em meio com concentração reduzida ou em ausência da citocinina (Kerbaudy, 1999).

Observa-se que a conversão da massa verde em plantas quando estas passaram a não receber mais a citocinina BAP indica um processo de desintoxicação e que, o surgimento dessas estruturas irregulares estão estreitamente ligadas às concentrações elevadas e à permanência no meio de cultura. Pelo período e concentração a que foram

expostas ao BAP, o efeito pôde ser revertido, caracterizando uma alteração fisiológica temporária em resposta a uma condição estressante.

As plantas provenientes de BIT com BAP que foram transferidas para cultivo em meio sem BAP (PsBAP) apresentaram os maiores valores de atividades de POD em relação aos demais tratamentos (Tabela 2).

A peroxidase está relacionada com os processos de crescimento e diferenciação celular, bem como com as mudanças morfogenéticas em resposta a estresses físico, químico e biológico. Geralmente, durante a iniciação de órgãos e em regiões de ativa divisão celular, a atividade da peroxidase aumenta por ser essencial ao metabolismo do ácido indolacético (AIA), modificando o balanço hormonal na planta, modulando a morfogênese (Lima et al., 2002). Assim, a aumentada atividade da POD nas plantas que passaram a ser cultivadas sem BAP poderia estar expressando a formação e o crescimento de raízes na ausência de BAP (Figura 6).

Os resultados da atividade da POD nas raízes também corroboram com essa hipótese, uma vez que no tratamento em que as plantas não receberam BAP, o crescimento radicular foi mais intenso e coincidiu com uma maior atividade da POD no sistema radicular (Tabela 2). A auxina regula a rizogênese (Taiz and Zeiger, 2004), estimulando a indução e iniciação, mas inibe o crescimento, de forma que o catabolismo auxínico, catalizado pelas peroxidases, assegura o crescimento radicular (Kevers et al., 2004). Alguns autores relacionam o aumento da atividade das peroxidases com a capacidade de adaptação de plantas submetidas a condições estressantes, podendo a atividade da POD ser identificada como um marcador bioquímico de estresse (Piza et al., 2003). Diante dos resultados aqui apresentados, o aumento na atividade da POD

parece estar assegurando o equilíbrio das plantas frente ao estresse, mas não pode ser apontada como um indicador de estresse.

Tabela 2. Atividade da peroxidase (POD), catalase (CAT), polifenoloxidase (PPO) e peroxidase do ascorbato (APX) expressas em U/mg de matéria fresca em massas verdes e plantas de cana-de-açúcar variedade RB872552 aos 20 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com ou sem BAP, na parte aérea (pa) e nas raízes (rz).

Tratamentos	Atividades enzimáticas			
	POD	CAT	APX	PPO
McBAP	1.244,76 b	346,82 b	1.425,61 a	2.232,31 ab
MsBAP	1.239,17 b	231,60 b	1.145,94 ab	1.338,83 c
PcBAP	1.531,78 b	284,86 b	1.331,21 a	1.949,31 b
PsBAP (pa)	2.635,62 a	686,07 a	844,77 c	2.409,45 a
PssBAP (pa)	1.054,21 b	666,77 a	905,43 bc	2.069,81 b
PsBAP (rz)	1.287,87 b	1.911,49 a	2.158,58 b	2.280,51 b
PssBAP(rz)	3.561,12 a	1.540,69 a	3.492,11 a	3.437,32 a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade, dentro de cada coluna, para parte aérea ou raiz.

A atividade da CAT foi maior nas plantas sem BAP do que nas massas verdes e nas plantas com BAP. Nas raízes, não houve diferença na atividade da CAT entre as plantas que passaram por tratamento com BAP e as que não foram tratadas com a citocinina (Tabela 2). A atividade de APX exibiu um padrão exatamente contrário ao da CAT, ou seja, as maiores médias da atividade da APX foram encontradas nos tratamentos que continham BAP (McBAP e PcBAP). De acordo com Arora and Rampal (2002), o nível da catalase presente nos peroxissomos é ineficiente na remoção de baixas concentrações de H₂O₂, sendo essas moléculas reduzidas no ciclo do ascorbato-glutationa, sob a ação da APX e outras enzimas do ciclo. Portanto, a atuação da CAT torna-se mais importante quando a concentração de peróxido de hidrogênio está em níveis mais elevados. A exposição das plantas ao BAP acarretou alterações na morfogênese, com conseqüente entouceramento, típico de uma fitotoxidez, como já discutido anteriormente. Por outro lado, as citocininas podem atuar como antioxidantes não enzimáticos (Mytinová et al., 2010), e este papel do BAP pode explicar a menor

atividade da CAT nos tecidos vegetais cultivados em meio com citocinina. Plantas micropropagadas de fumo transgênico nas quais foi introduzido o gene CKX2 que codifica a enzima citocinina oxidase/desidrogenase, que degrada as citocininas, apresentaram maior atividade da CAT em resposta ao estresse salino e hídrico do que nas plantas selvagens (Mýtinová et al., 2010).

O aumento da atividade da APX nas plantas e massas verdes expostas ao BAP (Tabela 2) demonstra uma estratégia para a remoção do excesso de H_2O_2 gerado sob condição de estresse para manutenção da homeostase redox, livrando as células do estresse extremo (Jitesh et al., 2006). Zavaleta-Mancera et al. (2007) propuseram que citocininas ativam a defesa antioxidante e que o BAP pode induzir a atividade de algumas enzimas antioxidantes como APX. Synková et al. (2004) verificaram elevação nos níveis de APX em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) a partir da expressão do gene *IPT* (T-DNA gene 4) que codifica a proteína Isopentenil transferase (citocinina sintetase), responsável pela síntese das citocininas.

A peroxidase do ascorbato é uma enzima chave para o controle da concentração de H_2O_2 reduzindo-o a água às expensas do ascorbato, no ciclo do ascorbato-glutationa. No sistema radicular a atividade de APX foi maior nas plantas que não receberam BAP em nenhuma das fases da micropropagação (PssBAP), as quais apresentavam raízes maiores em número e tamanho do que nas demais plantas (Figura 6). Há registros de que a atividade da APX é induzida por tratamentos que favorecem o enraizamento e aumentam o número de raízes regeneradas (Tyburski et al., 2006). O alto nível de atividade de APX é característico de células que estão dividindo ativamente (Pinto et al., 2000).

A menor atividade de PPO foi registrada em massas verdes sem BAP (MsBAP) enquanto que em presença de BAP as massas verdes exibiram atividade de PPO equivalente a das plantas que tiveram o BAP suprimido do meio (Tabela 2). Nas raízes, a atividade enzimática foi maior nas plantas que não receberam BAP ao longo do cultivo *in vitro*, ao contrário da parte aérea dessas plantas. A PPO não apenas desempenha um papel importante no sistema de defesa, mas também na mobilização de fenóis (Ali et al., 2005). Segundo Campos et al. (2004) a PPO catalisa a hidroxilação e a degradação oxidativa de compostos fenólicos os quais, além do papel estrutural na parede celular, exercem uma função protetora contra a ação das ROS (Ali et al., 2006). Nas massas verdes observou-se uma relação inversa entre a atividade da polifenoloxidase e o teor de fenóis totais (Tabela 3), constatando-se também oxidação fenólica nas massas que permaneceram em contato com o BAP (McBAP). Lemos (2006) observou que a atividade máxima da PPO estava relacionada com a presença de compostos fenólicos livres e oxidação destes compostos a quinonas, pela PPO causa o escurecimento do meio de cultura (Figura 8).

O teor de fenóis aumentou na parte aérea de plantas e massas verdes quando foram transferidas para meio sem BAP (PsBAP e MsBAP), coincidindo com a indução do enraizamento nas plantas e massas verdes (Figura 6 e 7). A capacidade de alguns fenólicos em promover a formação de raízes parece estar ligada a inibição da oxidação da auxina livre, catalisada por peroxidases (Lee et al., 1980). Tem sido demonstrado que os compostos fenólicos atuam na regulação da organogênese, interagindo com reguladores de crescimento (Ozyigit et al., 2007). Nas plantas mantidas sem BAP, que apresentaram sistema radicular mais desenvolvido, o teor de fenóis foi inferior ao das plantas que estiveram previamente com BAP, o que pode ter favorecido o equilíbrio no

teor da auxina endógena, necessário para que não haja inibição do crescimento das raízes formadas (Kevers et al., 2004). Os menores teores de fenóis foram encontrados no material vegetal que foi mantido em presença de BAP, que não enraizaram, confirmando o papel dos fenóis na regulação do enraizamento (Figuras 6 e 7).

Tabela 3. Teor de fenóis totais expresso mg/g de matéria fresca da em massas verdes (M) e plantas (P) da variedade de cana-de-açúcar RB 872552 aos 20 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com e sem BAP.

Tratamentos	Fenóis totais
McBAP	1,97 c
MsBAP	3,36 ab
PcBAP	1,96 c
PsBAP (pa)	4,34 a
PssBAP (pa)	2,32 bc
PsBAP (rz)	1,76 b
PssBAP(rz)	3,03 a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade, dentro de cada coluna, para parte aérea ou raiz.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao teor de glutaciona total, enquanto que nas plantas do tratamento PssBAP o teor da glutaciona reduzida (GSH) foi superior aos demais tratamentos (Tabela 4). Há muito é conhecido que elevados níveis de GSH, e finalmente, a alta relação GSH/GSSG estão associados a regiões meristemáticas em crescimento ativo (Sanchez-Fernandez et al., 1997). Em relação a glutaciona oxidada (GSSG) o teor foi maior nas massas verdes transferidas para meio sem BAP (MsBAP) (Tabela 4).

Tabela 4. Teor da glutatona reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG) e glutatona total expressas em nmol/g de matéria fresca em plantas (P) e massas verdes (M) da variedade RB 872552 de cana-de-açúcar após 20 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com ou sem BAP.

Tratamentos	GHS	GSSG	Glutaciona total	GHS/GSSG
McBAP	173,19 bc	38,40 b	211,59 a	4,51
MsBAP	113,04 c	131,88 a	244,92 a	0,86
PcBAP	159,42 c	51,45 b	210,87 a	3,10
PsBAP (pa)	249,27 b	55,07 b	304,34 a	4,53
PssBAP (pa)	337,68 a	56,52 b	394,20 a	5,97
PsBAP(raiz)	160,33 a	42,57 a	211,05 a	3,77
PssBAP(raiz)	181,16 a	41,65 a	220,11 a	4,35

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade, dentro de cada coluna, para parte aérea ou raiz.

Shafer and Buettner (2001) demonstraram como o estado redox do par glutatona dissulfeto - glutatona (GSH/GSSG) é o melhor indicador do ambiente celular. Variações na contribuição relativa de GSH e GSSG para o pool de glutatona total ocorrem durante o desenvolvimento normal e em condições de estresse.

Como demonstrado por Noctor et al. (1998), a proporção de GSH é geralmente maior que 0,9 em condições ideais, embora desvios sejam observados como resultado do estresse. O valor da proporção de GSH em relação ao total de glutatona mais próximo daquele sugerido foi de 0,86, encontrado na parte aérea das plantas do tratamento MsBAP.

Numerosos extratos de plantas indicam que, mesmo na ausência de estresse, cerca de 5% da glutatona no tecido é encontrado na forma GSSG (Foyer and Noctor, 2009). Nas plantas mantidas sem BAP (PssBAP) foi encontrado o menor percentual de GSSG (14,33%), enquanto que nas massas verdes chegou a 53,85% do total de glutatona, evidenciando um alto nível de estresse. Como discutido por Foyer and Noctor (2009), um dos principais obstáculos na utilização do sistema glutatona como

um marcador de estresse é a incerteza se os resultados observados são uma resposta dinâmica (na fase inicial de uma resposta ao estresse) ou em fase de aclimação em estado estacionário.

AGRADECIMENTOS

À CAPES/REUNI, pela concessão de bolsa de mestrado; à Biofábrica Governador Miguel Arraes do CETENE, pela doação das mudas de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, M. B.; Hahn, E. J.; Paek, K.Y. 2006. Phenolic metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science* 171:147-154.
- Ali, M.B.; Hahn, E. J.; Paek, K.Y. 2005. CO₂-induced total phenolics in suspension cultures of *Panax ginseng* C.A. Mayer roots: role of antioxidants and enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:449–457.
- Aamir Ali, S. N.; Naz, S.; Siddiqui, F.A.; Iqbal, J. 2008. An Efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. *Pakistanian Journal Botany* 40(1):139-149.
- Arora, D. S.; Rampal, P. 2002. Laccase production by some *Phlebia* species. *Journal of Basic Microbiology* 42: 295–301.
- Barceló Coll, J.; Nicolás R.G.; Sabater G.B.; Sánchez T.R. 1988. *Fisiología vegetal*. Pirámide, Madri, Spain.
- Barrueto Cid, L.P. 2000. Cytokinins. p. 55-88. In: Barrueto Cid, L.P. (Ed.). *Introduction to plant hormones*.:Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF, Brasília, Brazil (in Portuguese).
- Bassan, J.; Bobrowski, V. L. 2003. Effect of different BAP concentrations on *in vitro* multiplication of *Bryophyllum* sp. p.188. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Atibaia,SP,Brazil (in Portuguese).
- Behera, K.K. and Sahoo, S. 2009. Rapid *in vitro* Micropropagation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) Through Callus Culture. *Nature and Science* 7(4) 1-10.

- Berris, L. S. J.; Sizer I.W. 1952. A espectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. The journal of biological chemistry 195:133-140.
- Biradar, R.; Biradar, D.P.; Patil, V.C.; Kambar, N.S. 2009. *In vitro* plant regeneration using shoot tip culture in commercial cultivar of sugarcane. Journal agricultere science 22(1):21-24.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-dye binding. Analitical Biochemistry 72:248-254.
- Brahm, R.U.; Oliveira, R.P. 2004. Potential for *in vitro* propagation of strawberry cultivars. Revista Brasileira de Fruticultura 26(3):507-510 (in Portuguese, with abstract in English).
- Campos, A.D.; Ferreira, A.G.; Hampe, M.M.V.; Antunes, I.F.; Brancão, N.; Silveira, E.P.; Osório, V.A.; Augustin, E. 2004. Peroxidase and polyphenol oxidase activity in bean anthracnose resistance. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39(7): 637-643 (in Portuguese, with abstract in English).
- Cassells, A.C.; Cury, R.F. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64:145-157.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. 2010. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2010/2011, primeiro levantamento, abril/2010. Disponível em: www.conab.gov.br [Accessed Aug. 06, 2010]
- Diniz, J.D.N.; Almeida, J.L.; Teixeira, A.L. de A.; Gomes, E.S.; Hernandez, F.F.F. 2003. Gibberellic acid (GA3) and 6-benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* growth of

Macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. *Ciência e Agrotecnologia* 27(4):934-938 (in Portuguese, with abstract in English).

Fatibelho-Filho, O.; Vieira, I.C. 2002. Analytical use of tissues and plant extracts as enzyme source. *Química nova* 25(3):455-464 (in Portuguese, with abstract in English).

Foyer, C.H.; Noctor, G. 2009. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants and redox signaling* 11(4):861-905.

Fráguas, C.B.; Pasqual, M.; Dutra, L.F.; Cazetta, J.O. 2004. Micropropagation of fig (*Ficus carica*) 'Roxo de Valinhos' plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 40(5):471-474.

Fráguas, C.B.; Dornelles, C.M.da V.; Lima, G.P.P. 2009. Benzylaminopurine and naphthalene acetic acid in the induction and *in vitro* multiplication of buds of pineapple cultivar 'IAC Gomo-de-mel'. *Ciência Rural* 39(6):1682-1687 (in Portuguese, with abstract in English).

Gaspar, T. et al. 2002. Concepts in plant stress physiology application to plant tissue cultures. *Plant growth regulation* 37:263-285.

Grattapaglia, D.; Machado, M. A. 1998. Micropropagation. p.183-260 In: Torres, A. L.; Caldas, L. S.; Buso, J. S., eds. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* Embrapa-SPI/CNPH, Distrito Federal, Brasília, Brazil (in Portuguese).

Grattapaglia, D.; Machado, M.A. 1990. Micropropagation. p.99-169 In.: Torres, A.C.; Caldas, L.S., eds. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPH, Distrito Federal, Brasília, Brazil (in Portuguese).

Griffth, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinilpiridine. *Analytical Biochemistry* 106: 207-212.

Grimaldi, F.; Grohskopf, M.A.; Muniz, A.W.; Guidolin, A.F. 2008. *In vitro* rooting of fruit of the Rosaceae family. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 7(2):160-168 (in Portuguese, with abstract in English).

Hewelt, A.; Prinsen, E.; Thomas, M.; Van Onckelen, H.; Meins J., F. 2000. Ectopic expression of maize knotted1 results in the cytokinin-autotrophic growth of cultured tobacco tissues. *Planta* 210:884-889.

Horwitz, H. 1995. Official method of analysis of the association of official agricultural chemists. 8 ed. As. Agricultural Chemistry, Washington, USA.

Jithesh M. N.; Prashanth S. R.; Sivaprakash K. R.; Parida A.K. 2006. Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. *Plant Cell* 25:865–876.

Kar, M.; Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319.

Kerbauy, G.B. 1999. Cellular competence and determination in cell cultures and plant tissues. p.519-531 In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, Distrito Federal, Brasília, Brazil (in Portuguese).

Kevers, C.; Franck, T.; Strasser, R. J.; Dommès, J.; Gaspar, T. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 77: 181-191.

Lee, T.T.; Starrat, A.N.; Jevnikar, J.J.; Stoesse, A. 1980. New phenolic inhibitors of the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 19:2277-2280.

- Lemos, S.D.C. 2006. Evaluation of elicitors of phenylpropanoid metabolism in *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) PUC, Porto Alegre, RS, Brazil (in Portuguese).
- Leshem, B.; Werker, E.; Shalev, D. P. 1988. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany* 62(3):271-276.
- Lima, G.P.P.; Barsalobres, C.; Piza, I.M.T.; Cereda, M.P. 2002. Effect of BAP and NAA and peroxidase activity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz cv mcol 22) cultivated *in vitro*. *Revista Brasileira de Agrociência* 8(2):107-110 (in Portuguese, with abstract in English).
- Lin, W.; Peng, Y.; Li, G.; Arora, R.; Tang, Z.; Su, W.; Cai, W. 2007. Isolation and functional characterization of PgTIP1, a hormone-autotrophic cells-specific tonoplast aquaporin in ginseng. *Journal of Experimental Botany* 58(5):947–956.
- Macêdo, C.E.C.; Silva, M.G.; Nobrêga, F.S.; Martins, C.P.; Barroso, P.A.V.; Alloufa, M.A.I. 2003. Concentrations of NAA and BAP in the micropropagation of pineapple L. Merrill (*Ananas comosus*) and the hydroponic cultivation of seedlings obtained *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25(3):501-504 (in Portuguese, with abstract in English).
- Mengel, K.; Kirkby, E.A. 2001 *Principles of plant nutrition*, 5th edn. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Mok, M.C.; Martin, R.C.; Mok, D.W.S. 2000. Cytokinins: biosynthesis metabolism and perception. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 36(2):102-107.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473– 497.
- Mýtinová, Z.; Motyka, V.; Haisel, D.; Gaudinová, A.; Lubovská, K.; Wilhelmová, N. 2010. Effect of abiotic stresses on the activity of antioxidative enzymes and contents of

phytohormones in wild type and AtCKX2 transgenic tobacco plants. *Biologia Plantarum* 54 (3):461-470.

Nakano, Y.; Assada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology* 22:867-880.

Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. p.179-248. In: Reinert, J.; Bajaj, Y. P. S. Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Springer Verlag, Berlin, Germany.

Noctor, G.; Arisi, A.C.M.; Jouanin, L.; Kunert, K.J.; Rennenberg, H.; Foyer, C.H. 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*. 49:623-647.

Oliveira, R.P.; Silveira, D.G.; Silva, S.O. 2001. BAP concentration and efficiency of micropropagation of banana tetraploid (AAAB group). *Scientia Agrícola* 58:73-78 (in Portuguese, with abstract in English).

Ozyigit, I.I.; Kahraman, M.V.; Ercan, O. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *African Journal of Biotechnology* 6 (1):003-008.

Pasqual, M.; Ramos, J. D.; Hoffmann, A.; Carvalho, G. R. 1998. Plant Tissue Culture: Technology and Applications: culture media. FAEPE/UFLA, Lavras, MG, Brazil (in Portuguese).

Picoli, E.A.T.; Otoni, W.C.; Figueira, M.L.; Carolino, S.M.B.; Almeida, R.S.; Silva, E.A.M.; Carvalho, C.R.; Fontes, E.P.B. 2001. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science* 160:857-868.

Pinto, M.C.; Tommasi, F.; Gara, L. 2000. Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle in cultured cells of tobacco Bright Yellow 2. *Plant Physiology Biochemistry* 38: 541-550.

Piza, I.M.T.; Lima, G.P.P.; Brasil, O.G. 2003. Peroxidase activity and protein levels in micropropagated pineapple plants in saline medio. *Revista Brasileira de Agrociência* 9:361-366 (in Portuguese, with abstract in English).

Pospíšilová, J.; Haisel, D.; Synkova, H.; Catsky, J.; Wilhelmová, N.; Plzánková, S.; Prochárková, D.; Sránek, F. 2000. Photosynthetic pigments and gas exchange during *ex vitro* acclimatization of tobacco plants as affected by CO₂ supply and abscisic acid. *Plant Cell, tissue and organ culture* 61:125-133.

Preece, J. E. 1995. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? *Plant tissue culture and biotechnology* 1(1):26-37.

Radmann, E.B.; Bianchi, V.J.; Oliveira, R.P.de; Fachinelo, J.C. 2009. *In vitro* multiplication and elongation of shoots of micropropagated rootstock 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.) *Revista Brasileira de Fruticultura* 31(3):16-26 (in Portuguese, with abstract in English).

Ramage, C.M.; Williams, R.R. 2004. Cytokinin-induced abnormal shoot organogenesis is associated with elevated Knotted1-type homeobox gene expression in tobacco. *Plant Cell Reports* 22:919–924.

Salisbury, J.B.; Ross, C.W. 1985. Plant development. p.290-447 *In: CAREY, J.C. Plant physiology*. 3.ed. Belmont, Wadsworth,USA.

Sánchez-Fernández, R., Fricker, M.D., Corben, L.B., White, N.S., Sheard, N., Leaver, C.J., Van montagu, M., Inzé, D., May, M.J. 1997. Cell proliferation and hair tip growth

in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. Proc. Natl. Acad. Sci. 94:2745- 2750.

Shafer, F.Q.; Buettner, G.R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radicals Biology Medicine 30:1191-1198.

Silva, F. de A. S. e. 2008. Assistat 7.5 beta. DEAG-CTRN-UFCG Campina Grande, PB, Brazil.

Souza, A.V.; Pereira, A.M.S. 2007. Rooting of *in vitro* plants. Revista Brasileira de Plantas Medicinaias 9(4):103-117 (in Portuguese, with abstract in English).

Souza, S. da S.; Junghans, T.G. 2006. Introduction to micropropagation of plants. EMBRAPA, Cruz das Almas, BA, Brazil 1:79-96 (in Portuguese).

Synkova, H.; Semoradova, S.; Burketova, L. 2004. High content of endogenous cytokinins stimulates activity of enzymes and proteins involved in stress response in *Nicotiana tabacum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 169–179.

Taiz, L.; Zeiger, E. 2004. Plant physiology. Artmed, Porto Alegre, RS, Brazil (in Portuguese).

Tyburski, J.; Jasionowicz, P.; Tretyn, A. 2006. The effects of ascorbate on root regeneration in seedling cuttings of tomato. Plant Growth Regulation 48:157–173.

Vieira, A.R.A.; Silva, C.M.; Souto, E.R.de; Hata, F.T.; Machado, M.F.P.S.; Marcuz, F.S. 2009. Different concentrations of 6-benzylaminopurine and kinetin on *in vitro* micropropagation RB855156 and RB867515 varieties of cane sugar. Campo Digital 4(1):122-126. (in Portuguese, with abstract in English).

Villa, F.; Pasqual, M.; Souza, A.das G.;Vilela, X.M.de S. 2010. Culture medio and growth regulators on *in vitro* propagation of blackberry. *Scientia Agraria* 11(2):109-117 (in Portuguese, with abstract in English).

Zavaleta-mancera, H.A.; López-Delgado, H.; Loza-Tavera; Mora-Herrera M.; Trevilla-García, C.; Vargas-Suárez, M.; Ougham, H. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journaul of Plant Physiology* 164(12): 1572-1582.

CONCLUSÕES GERAIS

- O surgimento de massas verdes está associado às concentrações elevadas de 6-benzilaminopurina (BAP) e exposição prolongada do material vegetal à esta citocinina.
- Pelo período e concentração a que foram expostas ao BAP, o efeito pôde ser revertido, caracterizando uma alteração fisiológica em resposta a uma condição estressante.
- Através das atividades antioxidativas confirma-se que o material vegetal estudado encontrava-se em condições de estresse.

ANEXO

**INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO A REVISTA
SCIENTIA AGRICOLA**

A 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 à fonte.

Instruções gerais

- Texto e ilustrações dos originais submetidos à apreciação pelo corpo editorial devem ser escritos em língua inglesa, segundo as regras de ortografia e gramática norte-americana.
- Manuscritos deverão ser organizados em MS Word para Windows ou software compatível, fonte Times New Roman 12, margens 3,0 cm, espaçamento duplo. O manuscrito deve ter um máximo de 30 páginas (papel A4); linhas e páginas devem ser numeradas sequencialmente, ilustrações e tabelas inclusive.
- Os manuscritos devem trazer uma página de rosto discriminando os nomes completos dos autores; o(a) autor(a) correspondente deve ser identificado(a) por um asterisco e o endereço eletrônico institucional do autor(a) correspondente deve ser informado; a afiliação / endereço funcional do autor(a) correspondente deve ser informado da maneira mais detalhada possível.
- Organizar os manuscritos no formato Introdução/Material e Métodos/Resultados e Discussão, contendo: Título (restringir a um máximo de 15 palavras); Resumo (máximo de 250 palavras); Palavras-chave (cinco); Introdução (máximo de 25 linhas); Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões (opcional); Agradecimentos (opcional); Referências bibliográficas.

Tabelas e Figuras:

- **Tabelas:** Devem ser numeradas sequencialmente com algarismos arábicos, e geradas com a ferramenta "Tabela" do MS Word ou MS Excel (manuscritos contendo tabelas coladas como figuras serão devolvidos aos autores). Os títulos devem aparecer imediatamente acima do corpo das tabelas. Numere figuras e gráficos sequencialmente usando algarismos arábicos.
- **Figuras/Gráficos:** Figuras e gráficos devem ser geradas em MS Excel. Títulos e legendas devem aparecer abaixo da figura/gráfico.
- **Fotografias:** Fotografias devem ser apresentadas como arquivo "tagged image format [TIF]", 300 DPI. Fotografias aparecerão como figuras no formato final do artigo e devem, portanto, ser identificadas na numeração sequencial das figuras.

Referências

As referências e citações para artigos da *Scientia Agricola* serão organizadas utilizando o estilo de formato mínimo 'autor, ano' ou 'nome (ano)'. Checar se todas as citações no texto constam da lista de referências bibliográficas. Os exemplos:

1. Apenas um autor: Reichardt (2000) ou (Reichardt, 2000);
2. Dois autores: Fiorio and Demattê (2009) ou (Fiorio and Demattê, 2009);
3. Três ou mais autores: Rosso et al. (2009) ou (Rosso et al., 2009);
4. Organizar as referências em ordem alfabética e cronologicamente dentro de parênteses, e use (;) ponto e vírgula para separar citações múltiplas dentro de parênteses, por exemplo: (Boleli, 2003; Boerjan, 2006; Muraroli and Mendes, 2003);
5. Identificar múltiplas citações 'mesmo autor, mesma data' com a ajuda de letras minúsculas, por exemplo: (Cyrino, 2004a, b);
6. Usar o estilo "autor-ano" para ordenar a lista de referências, e: (i) abreviar os primeiros e segundos nomes dos autores, mas nenhuma outra palavra; (ii) usar letras maiúsculas para todos os acrônimos, isto é, quando o autor for uma organização; (iii) utilizar letras maiúsculas para a 1ª letra do sobrenome e demais iniciais dos autores, que deverão ser separados por um ponto (.); (iv) separar autores por ponto-e-vírgula; (v) não usar "e comercial" (&) nas citações, nem na lista de referências; (vi) não usar caracteres

grifados ou negritados para destacar qualquer parte da referência; (vii) usar letras maiúsculas na 1ª letra dos títulos de livros e de periódicos; (viii) não usar vírgula (,) para separar o título do periódico e o volume; (ix) separar os números de volume do periódico das páginas por dois pontos (:); (x) usar os números completos das páginas; (xi) separar os números de página por um traço (-); (xii) separar os grupos de páginas por uma vírgula se o artigo foi publicado em páginas descontinuas; (xiii) discriminar o número da edição de um livro ou manual como "2ed", por exemplo; (xiv) sobre livros, manuais e/ou anais de eventos, nomear os editores ou a editora antes de discriminar a localidade sede dos editores ou da editora; (xv) separar os editores ou a editora da localidade por meio de uma vírgula (,); e (xvi) nestes casos, declarar os nomes da cidade, do estado e do país.

6.1 Revistas/Periódicos Científicos

Guillard, R.R.L.; Wangersky, P. 1958. The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. *Limnology and Oceanography* 3: 449-454.

6.2 Livros

6.2.1 Livros com autores

Pais, I.; Jones Jr., J.R. 1998. *The Handbook of Trace Elements*. St. Lucie Press, Boca Raton, FL, USA.

6.2.2 Livros com editores/organizadores

Day, W.; Atkin, R.K., eds. 1985. *Wheat Growth and Modelling*. Plenum Press, New York, NY, USA.

6.2.3 Livros (e manuais) com organização/instituição como autor ou editora/organizadora

Association of Official Analytical Chemists - International [AOAC]. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

6.3 Capítulo de Livro

Sharpley, A.N.; Rekolainen, S. 1997. Phosphorus in agriculture and its environmental implications. p. 1-53. *In*: Tunney, H.; Carton, O.T.; Brookes, P.C.; Johnston, A.E., eds. Phosphorus loss from soil to water. CAB International, New York, NY, USA.

6.4 Anais

6.4.1 Anais com editores/organizadores

Olson, F.W.; White, R.G.; Hamre, R.H., eds. 1985. Proceedings of the Symposium on Small Hydropower and Fisheries. The American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA.

6.4.2 Anais com organização/instituição como autor ou editor/organizador

Sociedade Brasileira de Zootecnia [SBZ]. 1989. Proceedings of the Annual Meeting of the Brazilian Society of Animal Sciences 25. SBZ, Brasília, DF, Brazil.

6.4.3 Artigo completo em anais

Hunn, R.C. 1985. Case study: Determining instream flow requirements for the Arbuckle Mountain hydroelectric project. p. 223-230. *In*: Olson, F.W.; White, R.G.; Hamre, R.H., eds. 1985. Proceedings of the Symposium on Small Hydropower and Fisheries. The American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA.

6.5 Artigos sem autores (anônimos)¹

Anonymous. 1986. TNT, RDX, HMX, and 2,4-DNT in waste water and groundwater liquid chromatographic method first action. Changes in Methods. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 69: 366-367.

¹Os autores têm a opção de citar como manuais (6.2.3) as contribuições anônimas. Nesse caso, siga o exemplo a seguir:

Anonymous. 2005. Official Methods of Analysis. 18ed. Association of Official Analytical Chemists - International [AOAC], Gaithersburg, MD, USA.

6.6 Fontes eletrônicas

6.6.1 Elementos necessários para listar citações de sites da rede mundial de computadores:

A autoria, autor ou fonte. Ano. O título do documento da web ou página da web (isto é, título principal da página). [meio] (data de atualização). Disponível em: endereço completo para localizar o recurso (URL / endereço) [Accessed Sep. 19, 1992]

6.6.2 Elementos necessários para listar publicações disponíveis na rede mundial de computadores:

A autoria, autor ou fonte. Ano. O título do documento ou página da web. [meio] Produtor/Editor. Disponível em: endereço completo para localizar o recurso [Accessed Sep. 19, 1992]

6.7 Outros materiais bibliográficos

6.7.1 Não serão aceitos como referência os resumos de simpósios ou qualquer outro evento científico, tese e dissertações, correspondência de e-mail ou lista de discussão; trabalhos não publicados; publicações informais ou internas (isto é: manuscritos, folhetos, etc.), ou qualquer material impresso ou eletrônico em que a fonte não puder ser efetivamente documentada.

6.7.2 Citar uma comunicação pessoal também não é incentivado, se este tipo de material for absolutamente necessário para explicar a hipótese e os resultados dos autores, uma nota de rodapé com as informações necessárias ou referência deve ser incluída, fornecendo tantos detalhes quanto possível.

7. Listagem de referências não escritas em inglês

A maioria das referências fornece títulos e/ou resumos em inglês quando a linguagem da publicação original é diferente da inglesa. Quando listar estas ou quaisquer outras

referências, por favor, forneça o título em inglês, informando adicionalmente a linguagem do artigo original no final da referência, como exemplificado a seguir:

Baretta, D.; Santos, J.C.P.; Figueiredo, S.R.; Klauberg-Filho, O. 2005. Effects of native pasture burning and Pinus monoculture on changes in soil biological attributes on the Southern Plateau - Brazil of Santa Catarina Revista Brasileira de Ciência do Solo 29: 715-724 (in Portuguese, with abstract in English).

Raij, B. van; Andrade, J.C.; Cantarella, H.; Quaggio, J.A. 2001. Chemical analysis for evaluation of the fertility of tropical soils. Instituto Agronômico, Campinas, SP, Brazil (in Portuguese).

Informações Complementares

Manuscritos envolvendo avaliação da bioatividade de produtos químicos e/ou biológicos, incluindo reguladores do crescimento, em insetos, ácaros, fungos, bactérias, nematóides e plantas daninhas, não serão objeto de análise para publicação na *Scientia Agricola*.

Os manuscritos devem obedecer os critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área. Unidades e medidas devem seguir o Sistema Internacional.

Os conceitos e opiniões contidos nos artigos são de exclusiva responsabilidade dos(as) autores(as).

Encaminhamento de artigos

Envie os manuscritos para scientia@esalq.usp.br. Cada co-autor(a) deve enviar uma mensagem eletrônica para scientia@esalq.usp.br declarando sua concordância com a submissão do manuscrito à consideração do corpo editorial da *Scientia Agricola*.