

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - MELHORAMENTO
GENÉTICO DE PLANTAS

LAIS TOMAZ FERREIRA

**USO DA ILUMINAÇÃO POR LEDs NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E SEU
EFEITO NA ACLIMATIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

RECIFE
AGOSTO/2015

LAIS TOMAZ FERREIRA

**USO DA ILUMINAÇÃO POR LEDs NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E SEU
EFEITO NA ACLIMATIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

Orientação

DSc. Lilia Gomes Willadino – Orientadora

Professora, Departamento de Biologia – UFRPE

DSc. Marina Medeiros de Araújo Silva

Pesquisadora, Instituto Nacional do Semiárido – Insa/MCTI

RECIFE

AGOSTO/2015

USO DA ILUMINAÇÃO POR LEDs NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E SEU
EFEITO NA ACLIMATIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR

LAIS TOMAZ FERREIRA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 09/10/2015

ORIENTADORA:

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

EXAMINADORES:

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

DSc. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva
Professora do Departamento de Biologia – UFRPE

As minhas orientadoras Lilia
Willadino e Marina Medeiros, pelo
apoio e por acreditarem em mim,
Dedico.

Aos meus pais,
pelo incentivo, amor, dedicação
e por me apoiar sempre,
Ofereço.

"Os grandes feitos são conseguidos não
pela força, mas pela perseverança."
(Samuel Johnson)

Agradecimentos

A Deus por sempre estar presente em minha vida, me guiando e me fortalecendo a cada passo e em cada etapa da minha vida. Pois Deus me fortalece com sua magnitude esplêndida, pois tudo posso naquele que me fortalece.

A minha família que tanto amo, minha Mãe e meu Pai pelo incentivo, por tudo que me proporcionam, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e pela educação, as palavras não cabe minha gratidão. Ao meu irmão por sempre estar ao meu lado e por sempre estar comigo, até nas horas de trabalho.

A minha orientadora Profa. Lilia Willadino por ter me concedido a oportunidade de estagiar no LCTV, pois a partir disto construímos uma grande amizade e confiança, base de um excelente trabalho que construímos juntas, pois sem a confiança nada teria sido feito. Obrigada por todo ensinamento, experiência, dedicação, apoio e incentivo.

As professoras Terezinha Camara e Cláudia Ulisses, pela amizade, carinho, ensinamento, dedicação e apoio ao meu trabalho e ao trabalho dia a dia do LCTV, que é de extrema importância.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Melhoramento Genético de Plantas pela assistência e colaboração.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos meus grandes e incríveis amigos que construí: Well, Marina, João, Luciana e Fernando. A eles agradeço toda amizade, carinho, parceria, companheirismo, ajuda, dedicação e esforço. Pelos incríveis momentos que passamos juntos no LCTV e na vida. Com vocês o trabalho ficou mais gostoso, mais suave e mais prazeroso. Em especial agradeço a Well por toda ajuda nas análises das enzimas e pela companhia nos almoços. E a Marina por todo ensinamento passado principalmente na anatomia e ajuda nas análises, fora a excelente contribuição e orientação no trabalho, você foi de suma importância.

A Marciana pelos ensinamentos, amizade, carinho e conselhos pessoais passados.

A Lindomar pela ajuda, amizade e carinho que construímos ao longo de uma experiência que compartilhamos.

Ao meu noivo pela ajuda, compreensão, incentivo, amor e ombro amigo que estava sempre ali para me apoiar.

A Carlinha pela amizade, carinho e por me escutar sempre que estava precisando, e por tudo que passamos juntas.

As amigas de turma do Mestrado Yrlânia, Tuany e Marta pela amizade e ajuda nos trabalhos e estudos.

Aos amigos do LCTV Rodolfo, Ronaldo, Arquimedes, Lili, Neto, Gemima, Natália e Aline pela amizade e por todas as tardes e almoços de muita descontração.

As minhas amigas inesquecíveis da graduação Duda e Fabi, pela amizade e carinho, onde dividimos experiência e momentos incríveis.

Muito obrigada por compartilharem do meu sonho!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro
ES - Embriogênese Somática
LEDs - Diodos Emissores de Luz
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
KIN - Cinetina
BAP - 6-benzilaminopurina
ESI - Embriogênese Somática Indireta
ESD - Embriogênese Somática Direta
GFP - Green Fluorescent Protein
 $O_2^{\cdot-}$ - Radical superóxido
 1O_2 - Oxigênio singleto
 H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio
 OH^{\cdot} - Radical hidroxila
SOD - Superóxido Dismutase
CAT - Catalase
APX - Ascorbato Peroxidase
AsA - Ácido Ascórbico
GSH - Glutathione
GR - Glutathione Redutase
ESPs – Protocormos
NaOCl - Hipoclorito de sódio
FL - Lâmpada fluorescente
LED- Diodos Emissores de Luz
FAA 50 - Formaldeído 50%
ANA - Ácido Naftalenoacético
TCA - Ácido Tricloroacético
MDA - Malondialdeído
TBA - Ácido Tiobarbitúrico
PVP - Polivinilpirrolidona
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
BSA - Albumina de Soro Bovino
chl *a* – Clorofila *a*
chl *b* - Clorofila *b*
PAF - Perda de Água em Folhas
AIA - Ácido Indol-3-Acético

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Produtividade agrícola (t/ha) da cana-de-açúcar por idade de corte. Fonte: CONAB, 2015..... 14

Figura 2. Variedades plantadas e cultivadas no Brasil, safra 2012. Fonte: RIDESA, 2014..... 15

Figura 3. Porcentagem de resposta de tecidos vegetais à fotossíntese em função do comprimento de onda da luz recebida. Fonte: Oliveira et al. (2011).....27

CAPÍTULO II – USO DA ILUMINAÇÃO POR LEDs NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E SEU EFEITO NA ACLIMATIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Figura 1. Distribuição espectral de energia relativa em lâmpadas fluorescentes brancas e LED LabPAR.....35

Figura 2. Influência da iluminação, 2,4-D e BAP na embriogênese somática da variedade RB98710. A) formação de calo no meio C1 sob FL; B) presença de calo/embrião no meio C2 sob FL; C) presença de calo por todo explante no meio C1 sob LED; D) presença do prolongamento foliar e calo na extremidade no meio C2 sob LED; E) regeneração de plantas sob FL; F) regeneração de plantas sob LED.....40

Figura 3. Estudo histológico da embriogênese somática na variedade RB98710. A, B, C e D - Tratamento C1, com iluminação por LED. c = calo embriogênico, ex = células do explante, e = embrião somático, ep = células da epiderme, pa = células de parênquima. Barra = 100µm.....41

Figura 4. Efeito da iluminação (FL e LED) em concentração de (4,44 µM) de BAP e (6,45 µM) de KIN na multiplicação da variedade RB98710 obtidas por ES. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....43

Figura 5 Efeito da iluminação (LED e FL) na perda de água na variedade RB98710 de cana-de-açúcar: (A) ao final do enraizamento in vitro e (B) aos 15 dias de aclimatização.....46

Figura 6 Alterações nos níveis de H₂O₂ (A) e MDA (B) e nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (C), APX (D), CAT (E) em plantas aclimatizadas da variedade RB98710, provenientes do cultivo in vitro sob iluminação LED e FL. Médias seguidas de mesma letra minúscula entre iluminação e letra maiúscula entre os dias de coleta não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.....48

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1- Regeneração de plantas via embriogênese somática indireta em cana-de-açúcar.....25

Tabela 2- Classificação e descrição de calos de cana-de-açúcar, de acordo com Ho e Vasil (1993) e Taylor et al. (1992).....22

CAPÍTULO II – USO DA ILUMINAÇÃO POR LEDs NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E SEU EFEITO NA ACLIMATIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Tabela 1- Efeito da concentração de 2,4-D + BAP e do sistema de iluminação (LED e FL) na embriogênese somática da variedade RB98710.....38

Tabela 2- Efeito da iluminação LED e FL sobre parâmetros de crescimento e densidade estomática (mm²) em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes da embriogênese somática, ao final do enraizamento in vitro e aos 15 dias de aclimatização.....44

Tabela 3- Efeito da iluminação LED e FL nos conteúdos de pigmentos fotossintéticos em plantas da variedade RB98710, ao final do enraizamento in vitro e aos 15 dias de aclimatização.....45

Tabela 4- Efeito da iluminação LED e FL nos teores de H₂O₂ e MDA e na atividade das enzimas antioxidantes SOD, APX e CAT em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, ao final do enraizamento in vitro.....47

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO I.....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Cana-de-açúcar	17
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	19
2.3. Organogênese.....	21
2.4. Embriogênese somática	22
2.5. Aclimatização.....	27
2.6. Diodos Emissores de Luz (LEDs) no cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	29
3. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO II.....	45
USO DA ILUMINAÇÃO POR LEDs NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E SEU EFEITO NA ACLIMATIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	46
RESUMO.....	46
INTRODUÇÃO.....	47
MATERIAL E MÉTODOS.....	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
AGRADECIMENTOS.....	64
REFERÊNCIAS.....	64
CONCLUSÕES GERAIS.....	70
ANEXO.....	72
INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA IN VITRO CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY – PLANT.....	73

RESUMO

A fonte de luz utilizada no cultivo *in vitro* interfere na morfogênese e contribui na qualidade das mudas obtidas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de LEDs na indução da embriogênese somática, na micropropagação e como este se reflete na aclimatização da cana-de-açúcar (RB98710). Para indução da ES inoculou-se segmentos de folhas imaturas em meio MS suplementado com duas combinações de 2,4-D e BAP, formando os tratamentos: C1- 13,6 μM de 2,4-D + 2,2 μM de BAP e C2- 9 μM de 2,4-D + 1,1 μM de BAP. Para a regeneração das plantas utilizou-se meio desprovido de regulador de crescimento. Para multiplicação utilizaram-se as concentrações de 4,44 μM de BAP e 4,65 μM de KIN durante seis subcultivos consecutivos; e para o enraizamento, utilizou-se 5,37 μM de ANA. Os cultivos permaneceram sob lâmpadas fluorescentes - FL (50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ou LEDs (80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e após o enraizamento as plantas foram aclimatizadas. O meio C2 sob iluminação LED proporcionou maior percentagem de explantes responsivos, contudo, o maior número de plantas foi obtido em meio C1 sob iluminação FL, com média de 26,75 plantas/explante. As análises histológicas revelaram que houve formação de embriões direta e indiretamente do explante. As plantas cultivadas sob LEDs apresentaram maior taxa de multiplicação comparada à FL, com média de 5,06 e 4,20, respectivamente. Após a aclimatização, plantas provenientes da iluminação por LEDs apresentaram 96% de sobrevivência enquanto as que estavam sob FL apresentaram 75%. A perda de água em folhas foi cerca de 10% menor nas plantas sob LEDs. Em relação aos parâmetros biométricos e o teor de carotenoides, os melhores resultados também foram observados em plantas provenientes do cultivo *in vitro* sob LEDs. O conteúdo de H_2O_2 antes e durante a aclimatização mostrou-se maior em plantas sob LED, mesmo assim os conteúdos de MDA não diferenciaram entre as fontes de luz. As enzimas antioxidantes mostraram-se eficientes no combate ao estresse oxidativo, nos dois sistemas de iluminação. Assim, pode-se inferir que as plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 apresentam melhor taxa de multiplicação e desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* quando cultivadas sob LEDs.

Palavras-chave Qualidade da luz; micropropagação; densidade estomática; sobrevivência *ex vitro*; estresse oxidativo

ABSTRACT

The light source used in *in vitro* culture interferes in the morphogenesis and contributes to the quality of the obtained plantlets. Therefore, this study aimed to evaluate the use of LEDs in the induction of somatic embryogenesis, in the micropropagation and as this reflected in the acclimatization of sugarcane (RB98710). For ES induction immature leaf segments were inoculated on MS medium supplemented with two combinations of 2,4-D and BAP, forming treatments: C1- 13.6 μM of 2,4-D + 2.2 μM BAP and C2- 9 μM of 2,4-D + 1.1 μM BAP. For plant regeneration was used medium devoid of growth regulators. For multiplication used the concentrations of 4,44 μM BAP and 4,65 μM KIN during six consecutive subcultures; and for rooting, used 5.37 μM ANA. The cultures remained under fluorescent lights - FL ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) or LEDs ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and after rooting plants were acclimatized. The medium C2 under LED lighting provided a higher percentage of responsive explants, however, the largest number of plants was obtained under C1 under FL lighting, averaging 26.75 plants/explant. Histological analysis revealed that there was embryo formation directly and indirectly from the explant. Plants grown under LEDs showed a higher proliferation rate compared to FL, averaging 5.06 and 4.20, respectively. After acclimatization plants from LED lighting showed 96% survival while they were under FL had 75%. The loss of water in leaves was about 10% lower for plants in LEDs. With regard to biometric parameters and carotenoids content, the best results were observed in plants derived from *in vitro* culture under LEDs. The H_2O_2 content before and during the acclimatization was higher in plants under LED still MDA content not differentiate between sources of light. The antioxidant enzymes were effective in combating oxidative stress in both lighting systems. Thus, it can be inferred that plants of sugarcane variety RB98710 have better rate of multiplication and development *in vitro* and *ex vitro* when cultured under the LEDs.

Keywords Quality of light; micropropagation; stomatal density; survival *ex vitro*; oxidative stress

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1. Introdução Geral

A cana-de-açúcar ocupa em torno de 9 milhões de hectares de terras no Brasil, com produção de 634,8 milhões de toneladas na safra 2014/2015, representando um aumento de 3,1% em relação à safra anterior (CONAB, 2015). O Brasil destaca-se como líder na produção mundial, seguido por Índia e China. A cana-de-açúcar tem grande importância no agronegócio brasileiro por servir de matéria prima para a produção de açúcar e álcool (CONAB, 2015).

A Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA) é responsável pelo Programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar (PMGCA) do Brasil, visando melhorar a produtividade do setor. As variedades lançadas pela RIDESA representam 62% da área cultivada no país (RIDESA, 2014). Após o melhoramento genético, as novas variedades, com características superiores, são liberadas aos produtores. A disponibilidade destas variedades em larga escala é uma etapa crucial para a implantação de cultivos com genótipos elite (MENEZES et al., 2012). Diante disso, as técnicas de cultivo *in vitro* de plantas podem ser importantes para o desenvolvimento mais rápido de novas cultivares, seja para auxiliar os programas de melhoramento genético ou para acelerar a distribuição de materiais promissores (NOGUEIRA, 2013).

A embriogênese somática (ES) é o processo pelo qual células haploides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986). A formação de embriões somáticos dá-se através de vias de regeneração direta, quando ocorre a partir do próprio tecido do explante, ou indireta, quando é antecedida por uma fase de proliferação de calos. Ambas vias, já foram descritas para diferentes variedades de cana-de-açúcar, sendo a indireta a mais utilizada para estudos de transformação genética (TAPARIA et al., 2012). No entanto, ainda existem diversos fatores envolvidos no cultivo *in vitro* que podem aperfeiçoar a aplicação desta técnica, podendo torná-la exequível na produção comercial de mudas de cana-de-açúcar.

As plantas apresentam um alto grau de plasticidade fisiológica, morfológica e anatômica para diferentes espectros de luz (MULEO e MORINI, 2006). Devido a isto, pesquisas recentes têm estudando diferentes tipos de luz e seus efeitos no

desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (GUPTA e JATOTHU, 2013). Convencionalmente, em salas de crescimento são utilizadas lâmpadas fluorescentes brancas, que emitem um amplo espectro (350-750 nm), enquanto os diodos emissores de luz (LEDs) têm comprimento de onda específico e baixa emissão de calor (YEH e CHUNG, 2009). Muitos trabalhos já apontam o uso de LEDs como algo promissor no cultivo *in vitro*, como demonstrado em bananeira (VIEIRA et al., 2015), morangueiro (ROCHA et al., 2010), crisântemo (KIM et al., 2004), batata (SEABROOK, 2005), entre outros.

Atributos morfofisiológicos das plantas cultivadas *in vitro* podem ser regulados por propriedades espectrais dos LEDs, favorecendo a redução na taxa de mortalidade durante a fase de aclimatização (NHUT et al., 2003; VIEIRA et al., 2015). Tal fase é reconhecida como crítica no processo de micropropagação, devido à súbita alteração ambiental a que as plantas são submetidas (OSÓRIO et al., 2013), podendo levar à ocorrência de estresse oxidativo. Nesse caso, a extensão dos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (ROS) que são formadas depende da eficácia do sistema antioxidante, o qual inclui componentes enzimáticos e não enzimáticos (BAŤKOVÁ et al., 2008). Alterações na atividade de enzimas antioxidantes durante a aclimatização foram relatadas para diferentes espécies (ALI et al. 2005; FAISAL e ANIS 2009; AHMED e ANIS 2014) contudo, estudos referentes às modificações no metabolismo redox durante a aclimatização de plantas cultivadas *in vitro* com iluminação por LEDs ainda são escassos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi averiguar o uso de iluminação fluorescente e LED vermelho:azul na indução da embriogênese somática, regeneração de brotos e aclimatização, na variedade RB98710 de cana-de-açúcar e, adicionalmente, avaliar o efeito destas fontes de luz na aclimatização das plantas.

2. Revisão de Literatura

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, espécie semiperene, alógama, pertencente à classe Liliopsida (monocotiledônea), família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, é uma gramínea que se desenvolve bem em solos profundos, com boa aeração e drenagem. É considerada semiperene por permitir vários cortes sem a necessidade de replantio, sendo assim, o primeiro ciclo da cultura é chamado de cana-planta e, após o primeiro corte, inicia-se o ciclo da cana-soca. No decorrer dos cortes subsequentes a safra diminui, pois a resposta da cultura à aplicação de insumos é reduzida (Figura 1), sendo necessária a renovação do canavial em determinado momento (CONAB, 2015).

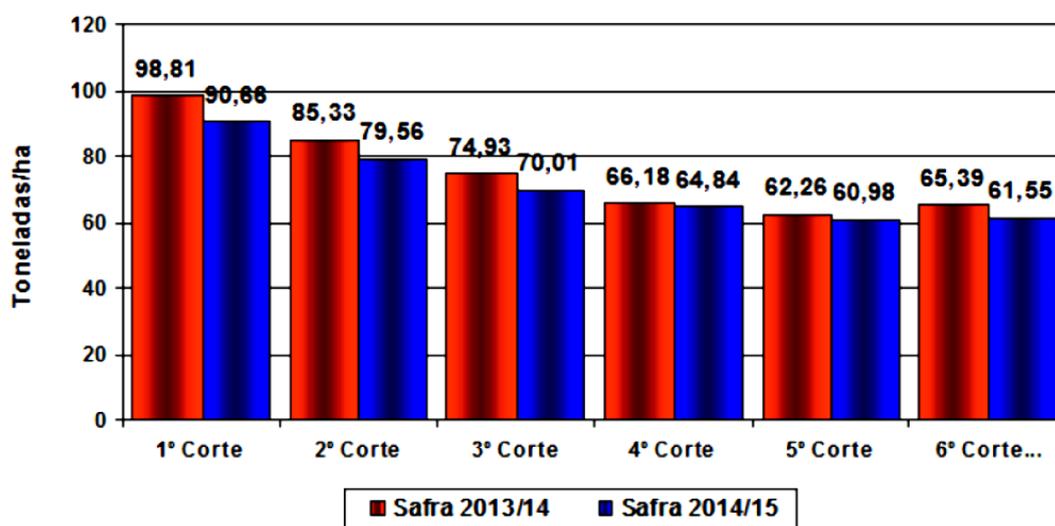


Figura 1- Produtividade agrícola (t/ha) da cana-de-açúcar por idade de corte. Fonte: CONAB, 2015.

A espécie possui metabolismo fotossintético C4, apresentando alta eficiência na conversão de energia radiante em energia química, chegando a acumular o dobro de biomassa de uma planta com metabolismo C3 (ALENCAR, 2012; HELLER-USZYNSKA et al., 2011). Plantas com metabolismo C4 apresentam mecanismo concentrador de CO₂, tornando-se mais competitivas sob condições de estresse, tais como altas temperaturas, altas intensidades luminosas e baixa disponibilidade de água, pois conseguem manter altas taxas fotossintéticas mesmo quando os estômatos permanecem parcialmente fechados (TAIZ e ZEIGER, 2013).

A cana-de-açúcar originou-se no sudeste da Ásia e na Nova Guiné e foi introduzida no Brasil durante o período colonial, por volta de 1502 (DILLON et al., 2007). Sempre teve importância para a economia do país, sendo o Brasil o seu maior produtor, seguido da Índia e China. Atualmente, representa a principal matéria-prima para a fabricação do açúcar, do etanol e da aguardente e, apesar de ser cultivada em todas as regiões do país, cerca de 50% de sua produção está concentrada no estado de São Paulo (CONAB, 2015).

A área cultivada com cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2015/16 está estimada em 9.070,4 mil hectares. Sete estados brasileiros são responsáveis por 92,1% da produção nacional, sendo São Paulo o maior produtor, seguido de Goiás, Minas Gerais e em sétimo lugar Pernambuco. A produção total de cana-de-açúcar na safra 2015/16 destinada à indústria está estimada em 654,6 milhões de toneladas, com acréscimo de 3,1% em relação à safra anterior. A Região Nordeste deverá ter um aumento de 4,3%, passando de 59,4 milhões de toneladas para 61,9 milhões de toneladas, o que corresponde a, aproximadamente, 8,9% da produção nacional (CONAB, 2015).

Atualmente, 62% da área cultivada com cana-de-açúcar no país utilizam variedades desenvolvidas pela RIDESA (Figura 2) (RIDESA, 2014).

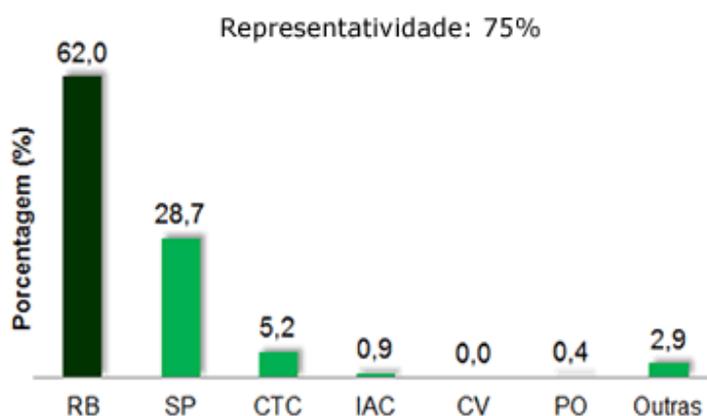


Figura 2- Variedades plantadas e cultivadas no Brasil, safra 2012. Fonte: RIDESA, 2014.

As espécies e cultivares do complexo *Saccharum* podem ser classificadas em espécies selvagens e cultivadas e, dentre as espécies cultivadas, em cultivares antigas (tradicionais) e cultivares modernas (GRIVET et al., 2004). As cultivares

tradicionais quase não são utilizadas atualmente no cultivo comercial, mas são importantes no melhoramento genético como progenitoras para geração de cultivares modernas, por servirem como fontes de caracteres (HEERDT, 2008). As variedades atuais são altamente poliploides e aneuploides, variando entre 100 a 130 o número de cromossomos (VETTORE et al., 2003).

O melhoramento genético tradicional apresenta algumas restrições para o desenvolvimento de novas cultivares com elevada produtividade e caracteres de interesse agrônomo, como tolerância a patógenos e pragas e elevado teor de sacarose (JOYCE et al., 2010). A demora na obtenção de novos materiais se dá principalmente pelo fato da cana-de-açúcar apresentar reprodução vegetativa, por meio da divisão de colmos. A liberação de uma nova variedade é um processo trabalhoso e demorado, levando de 10 a 14 anos desde a obtenção dos híbridos, passando pelas sucessivas seleções e, finalmente, as experimentações de campo (ALVAREZ et al., 1983).

Para superar essas restrições, pesquisadores vêm focando no aprimoramento de novas tecnologias eficientes para auxiliar as técnicas de melhoramento genético convencional e acelerar a obtenção das cultivares modernas de cana-de-açúcar, com características agrônomicas desejáveis (NOGUEIRA, 2013). E uma das técnicas que se destaca é o cultivo *in vitro* de plantas, por apresentar alta taxa de multiplicação de clones, produção de material livre de doenças em curto espaço de tempo, além de permitir a conservação e intercâmbio de germoplasma.

2.2. Cultivo *in vitro* de plantas

A cultura de tecidos vegetais é um conjunto de técnicas que permite o cultivo de explantes, sendo estes células, tecidos ou órgãos isolados da planta mãe, em condições de elevada assepsia e com rigoroso controle nutricional, de luminosidade e temperatura (GEORGE et al., 2008). Esta tecnologia está baseada na totipotencialidade das células e explora as condições que promovem a divisão celular e a reprogramação genética no ambiente *in vitro*, em resposta a um determinado estímulo (LOYOLA-VARGAS e VÁZQUEZ-FLOTA, 2006).

A cultura de tecidos compreende diversas técnicas, dentre as quais se destaca a micropropagação, também conhecida por clonagem ou propagação

vegetativa *in vitro* (FREITAS, 2014). A micropropagação é um método de propagação assexuada em que os explantes, por meio de divisões celulares, que podem ser induzidas por fitorreguladores, produzem uma grande quantidade de indivíduos, genética e fenotipicamente idênticos, que podem ser obtidos mediante organogênese e/ou embriogênese somática (CARVALHO et al., 2006; BHOJWANI e DANTU, 2013).

A cultura de tecidos pode dar suporte técnico a diversas áreas como a bioquímica, fisiologia vegetal, fitopatologia, citogenética, entre outras (CID, 2001). O seu sucesso depende de uma série de fatores, como meio de cultura, estado fisiológico da planta mãe, origem do explante e, sobretudo, da capacidade morfogênica do genótipo (COSTA et al., 2007). O crescimento e a morfogênese de células e tecidos *in vitro* são regulados pela interação e pelo balanço entre as substâncias adicionadas ao meio de cultura como também por substâncias produzidas de forma endógena (CHAPLA et al., 2009). A cultura de tecidos pode ser empregada de diversas maneiras no programa de melhoramento vegetal. Na dormência de sementes, com a técnica de germinação *in vitro*; em cruzamentos interespecíficos, com o resgate de embriões imaturos, entre outras aplicações (ANDRADE, 2002).

Estudos sobre o cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar iniciaram-se no Havaí, em 1961 (LIU, 1984). Posteriormente, vários protocolos para embriogênese e organogênese foram desenvolvidos, utilizando vários tipos de explantes, como inflorescências imaturas (LIU, 1993; BLANCO et al., 1997; GALLO-MEAGHER et al., 2000), folhas jovens (AHLOOWALIA e MARETZKI, 1983; HO e VASIL, 1983; CHEN et al., 1988; FITCH e MOORE, 1990; HOY et al., 2003) e meristemas apicais (AHLOOWALIA e MARETZKI, 1983; HOY et al., 2003). Hoje, a micropropagação da cana-de-açúcar já é explorada comercialmente em diversos países, através das biofábricas de plantas, onde as novas variedades são multiplicadas em larga escala (CHENGALRAYAN et al., 2005; LAKSHMANAN et al., 2006).

A regeneração *in vitro* de cana-de-açúcar pode ocorrer por duas rotas morfogênicas: organogênese e embriogênese somática (MELO, 2011). Em ambas, o material é regenerado a partir de meristemas apicais ou segmentos foliares imaturos, em cultivo convencional estático ou pela utilização de biorreatores de imersão temporária (LAKSHMANAN et al., 2006; GARCIA et al., 2007; MARDOCCO

et al., 2009). Contudo, os protocolos já estabelecidos, especialmente para a ES, não se aplicam para todas as variedades, uma vez que diversos fatores influenciam a regeneração e a estabilidade genética das plantas *in vitro* (SNYMAN et al., 2011).

2.3. Organogênese

A criação de uma nova organização celular nos tecidos e o surgimento de novos órgãos, onde antes eles não existiam, é chamada de organogênese. Esta pode ocorrer de duas formas: diretamente de um tecido vegetal (sem a proliferação de calos) ou indiretamente, a partir de células indiferenciadas ou desorganizadas, chamadas de calos (CID e TEXEIRA, 2010). Muitas vezes não é possível fazer uma clara distinção entre as formas direta e indireta, pois é comum a ocorrência simultânea dos dois tipos em um mesmo tecido. Rocha et al. (2012) demonstraram similaridade na resposta organogênica e características citológicas das células envolvidas em ambas as vias de regeneração a partir de explantes não meristemáticos de *Passiflora edulis*.

Brotos de cana-de-açúcar podem ser obtidos pela organogênese direta, por meio da exposição dos explantes a uma citocinina isolada ou pela alta razão citocinina:auxina; e indiretamente, por meio da reorganização de um novo meristema por intermédio do estágio de calo, em resposta a auxinas (SNYMAN et al., 2011). A regeneração direta em cana-de-açúcar foi estudada por diferentes autores (LAKSHMANAN et al., 2006; SNYMAN et al., 2006; KHAN et al., 2008; PATHAK et al., 2009), principalmente a partir do cultivo de ápices caulinares, enquanto a via indireta pode ser obtida a partir de meristemas apicais ou de segmentos foliares imaturos (DIBAX et al., 2013).

É preciso um ajuste às condições de cultivo para que diferentes tipos de células recebam estímulos alternativos refinando o sistema de regeneração para cada espécie, nas distintas vias (LAKSHMANAN et al., 2006). Além disso, o genótipo, a polaridade e, conseqüentemente, a orientação do tecido, o tamanho e o estágio de desenvolvimento dos explantes apresentam um papel determinante no potencial organogênico (LAKSHMANAN et al., 2006), variando de espécie para espécie (NOGUEIRA, 2013).

2.4. Embriogênese somática

A ES é o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas haploides ou diploides que se diferenciam em plantas completas, seguindo estádios de citodiferenciação embriogênicos característicos (GUERRA et al., 1999). Os embriões somáticos obtidos são morfologicamente semelhantes aos zigóticos, originando clones da planta mãe, já que não ocorre a fusão de gametas (CANHOTO, 2010). Neste processo, células somáticas diferenciadas e mitoticamente quiescentes podem recuperar o potencial embriogênico e originar novos embriões viáveis, através da reprogramação da expressão gênica (MARSONI et al., 2008). Isto é possível graças à expressão da totipotencialidade celular, postulada por Haberlandt, em 1902, o qual afirmava que todas as células somáticas contêm a informação genética necessária para a geração de uma nova planta.

O primeiro caso de ES foi relatado por Steward et al. (1958) e Reinert (1958), em cenoura (*Daucus carota* L.). Atualmente, esta técnica vem sendo desenvolvida para diferentes espécies. Uma característica marcante dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial, além da bipolaridade, ou seja, presença de ápice caulinar e radicular. Tais características permitem diferenciar a ES da organogênese (GUERRA et al., 1999). A ES e zigótica apresentam semelhanças quanto à morfologia do embrião e ao padrão de expressão de genes e proteínas (ZIMMERMAN, 1993; LINACERO et al., 2001). Por apresentarem fácil manipulação, os embriões somáticos são utilizados na caracterização morfológica, fisiológica, molecular e bioquímica durante o desenvolvimento da ES.

Podem ocorrer dois padrões de expressão da ES: o direto e o indireto. No primeiro, a formação dos embriões ocorre pela diferenciação das células do tecido do explante, sem a formação de calos (TAHIR e STASOLLA, 2006; NOGUEIRA, 2013). Já o padrão indireto, envolve um estágio intermediário de calo, que apresenta células em distintos estádios de diferenciação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos e, posteriormente, formar embriões somáticos (SUGIMOTO et al., 2011; NOGUEIRA, 2013). O tecido do explante tem diversos estádios de diferenciação e, conseqüentemente, diferentes graus de determinação, ou seja, não são naturalmente embriogênicos, exigindo que as células sofram uma indução para que ocorra a ES (GUERRA et al., 1999; NMAIVAYAM, 2007). É a partir das células competentes, aquelas que se mostram

sensíveis aos fatores de indução, que se alcança a fase de expressão, em que as células se diferenciam em embriões somáticos (GAJ, 2004; JIMENEZ, 2005).

Acredita-se que os explantes com padrão direto tenham como característica células pré-determinadas para a rota embriogênica, por reterem propriedades das células meristemáticas parentais. Tal fato poderia explicar a tendência de ocorrer, preferencialmente, em explantes com tecidos embrionários ou juvenis (FREITAS, 2014). Em contrapartida, o padrão indireto é característico de explantes derivados de tecidos mais diferenciados, ou maduros, necessitando que as células passem por vários ciclos de divisão e desdiferenciação celular para a aquisição da competência embriogênica (HARTMANN et al., 2002). A desdiferenciação é um processo pelo qual os padrões de transcrição e tradução genômica são alterados, definindo um novo padrão de desenvolvimento às células (FEHÉR et al., 2002).

A estratégia para a indução e a modulação da ES consiste primeiramente em determinar a melhor fonte de explante, que será excisado e inoculado em meio de cultura suplementado com alguma auxina, gerando complexos ou massas celulares pró-embriônicas (VIÑAS e JIMÉNEZ, 2011). Segundo Steiner et al. (2008), a ES pode ser dividida em dois ciclos básicos: o ciclo de indução e multiplicação das culturas embriônicas e o ciclo de maturação, onde serão obtidos embriões somáticos maduros, passíveis de regeneração. A conversão dos embriões somáticos em plantas é a última fase e ocorre em meio desprovido ou não de reguladores de crescimento (VAN DER VYVER, 2010; BASNAYAKE et al., 2011).

Os principais fatores que afetam a indução da ES são: o genótipo, a origem do explante, a composição do meio de cultura, o estágio de desenvolvimento do explante, temperatura, luz e, particularmente, os reguladores de crescimento, os quais atuam na regulação da aquisição da competência embriônica (TORRES et al., 1998). A capacidade de uma célula tornar-se embriônica depende do estágio fisiológico e da diferenciação dos tecidos (GUEYE et al., 2009). Os tecidos maduros têm um maior grau de metilação de DNA, provocando baixa capacidade de desdiferenciação (TERZI e LO-SCHIAVO, 1990). Outros agentes podem ser usados para a indução da embriogênese, como choques térmicos, variações nos níveis de pH e utilização de outros produtos químicos (GUERRA et al., 1999). Entretanto, o agente indutor mais utilizado é o regulador de crescimento, principalmente a auxina.

Vários tipos de explantes têm sido testados na ES em cana-de-açúcar, porém as folhas imaturas (LAKSHMANAN et al., 2006; SNYMAN et al., 2011) e as inflorescências em desenvolvimento (GALLO-MEAGHER et al., 2000; DESAI et al., 2004) são as mais prolíficas. Dentre os reguladores de crescimento, o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é o mais utilizado (Tabela 1), podendo ser aplicadas, também, combinações entre auxinas e citocininas, como 2,4-D + cinetina (KIN) (GILL et al., 2004; MITTAL et al., 2009) e 2,4-D + BAP (6-benzilaminopurina) (KAUR e GOSAL, 2009; SILVA et al., 2014), uma vez que a resposta é genótipo-dependente (GANDONOU et al., 2005).

Tabela 1- Regeneração de plantas via embriogênese somática indireta em cana-de-açúcar.

Tipo de Explante	Regulador de crescimento	Concentração (mg L ⁻¹)	Genótipos	Referências
Folhas imaturas	2,4-D	3	16 cultivares diferentes	Basnayake et al. (2011)
		2,2	SP-803280	Macedo (2010)
		2; 4; 8	RB872552	Silva (2010)
		2	RB92579 e RB93509	Dibax et al. (2013)
		5	CPF-246, SPF-234 e HSF-242	Nawaz et al. (2013)
		3	RB855156 e RB72454	Alcantara et al. (2014)
		2; 3,5	RB966928 e RB986419	Mudry et al. (2013)
	2,4-D, Dicamba e CPA	1,1; 2,2; 3,3 e 4,4	RB867515, RB928064 e RB925345	Ramos (2011)
	2,4-D + Cinetina	3 + 0,1	RB835486	De Jesus (2010)
	2,4-D + ANA	5; 10; 20; 40 e 50 + 1	<i>Saccharum edule</i>	Chandran (2011)
	2,4-D	2	NiF8	Wamaita et al. (2010)
Inflorescências imaturas	2,4-D	3	IJ76-316	Ahloowalia e Maretzki (1983)
Meristemas apicais	2,4-D	2,21	SP79-1011	Silveira et al. (2013)
		2,21	SP80-3280	Burrieza et. al. (2012)
Ápices caulinares	2,4-D	5	RB739735, RB758540 e Chunnee	Cidade et al. (2006)

De acordo com Sani e Mustapha (2010), o 2,4-D tem uma alta especificidade na indução de calos de cana-de-açúcar, sendo esta atribuída à presença de supostos receptores de 2,4-D na superfície da membrana celular do explante. Pasternak et al. (2002) relatam que o 2,4-D aumenta os níveis de auxina endógena nos explantes responsivos e por esse motivo é mais eficiente na resposta indutiva

dos tecidos. Explantes que são cultivados sem a presença de 2,4-D no meio de cultura não se desenvolvem, ficam amarronzados e necrosam totalmente em poucos dias de cultivo (TIEL et al., 2006; SANI e MUSTAPHA, 2010). Por outro lado, a manutenção por longos períodos na presença deste regulador, em repetidos subcultivos, pode causar instabilidade genética (GILL et al., 2006) e aumentar a probabilidade de variação somaclonal (FRANKLIN et al., 2006; LAKSHMANAN et al., 2006). Dessa forma, torna-se necessário o estudo do tempo ideal para a exposição a este regulador nas diferentes variedades.

A indução da embriogênese somática indireta (ESI) resulta na formação de diferentes tipos de calos, sendo estes classificados como embriogênicos e não embriogênicos (LAKSHMANAN, 2006), os quais diferem quanto a morfologia e ao potencial de regeneração (NABORS et al., 1983). O calo embriogênico forma pequenos embriões somáticos capazes de regenerar plantas completas, com raiz e parte aérea, por serem bipolares. Já os calos não embriogênicos são translúcidos e sem capacidade de regenerar plantas (NABORS et al., 1983; RASCHID e QURASHI, 1989). Alguns autores observaram e classificaram os calos formados em explantes de cana-de-açúcar, pois estes não apresentavam uniformidade em aparência e eram compostos por regiões morfologicamente diferentes. Ho e Vasil (1983) classificaram os calos em três tipos, enquanto Taylor et al. (1992) classificaram em quatro (Tabela 2).

Tabela 2- Classificação e descrição de calos de cana-de-açúcar, de acordo com Ho e Vasil (1993) e Taylor et al. (1992).

Tipo	Descrição dos calos	
	Ho e Vasil (1993)	Taylor et al. (1992)
1	Branco, nodular, altamente embriogênico	Semi-translúcido, não-embriogênico
2	Amarelo, friável, pode ser embriogênico	Amarelo cinzento, mucilaginoso, não embriogênico
3	Acinzentado, mucilaginoso, não embriogênico	Amarelo branco, nodular, altamente embriogênico
4	-	Amarelo, friável, organogênico

Embora estes autores tenham classificado os calos de forma diferente, ambos afirmaram que o embriogênico é branco e nodular, com células redondas e densamente citoplasmáticas. Outros autores descrevem também que os calos embriogênicos apresentam crescimento rápido, alta atividade metabólica e possuem mais proteínas solúveis, prolina livre, atividade proteolítica e açúcares solúveis em relação aos calos não embriogênicos (NIEVES et al., 2003). Por ser um híbrido

interespecífico, a cana possui respostas distintas quanto à formação de calos embriogênicos para cada cultivar, e a resposta morfogenética é muito influenciada pelo genótipo (MUDRY, 2011; BASNAYAKE et al., 2011).

Outro fator que influencia a resposta embriogênica é a intensidade luminosa (GARCIA et al., 2007). Na cana-de-açúcar, a maioria dos relatos da embriogênese ocorre em ausência de luz (GANDONOU et al., 2005; LAKSHMANAN, 2006; JOYCE et al., 2010), inclusive a formação de calos (GARCIA et al., 2007). Garcia et al. (2007) demonstraram que a resposta da embriogênese na presença da auxina é modulada pela luz. Na ausência da luz, a auxina (2,4-D e Picloram) induz a formação de calos embriogênicos (GARCIA et al., 2007).

A ES é considerada, potencialmente, a técnica mais importante dentre os métodos usados na propagação clonal, uma vez que é capaz de originar um grande número de plantas num curto período de tempo e, ao contrário de outras técnicas, não necessita da etapa de enraizamento, o que encurta o período de regeneração (CANHOTO, 2010). Lee (1987) relatou que obteve por meio da embriogênese somática direta (ESD) a produção de 78.400 mudas em um período de cinco meses.

Esta técnica pode ser utilizada também como ferramenta integrada aos programas de melhoramento genético, em especial quando associada às técnicas de transformação de plantas e engenharia genética (GUERRA et al., 1999), sendo a ESI preferencial para estudos de transformação, por formar maior número de células, aumentando as chances de se obter plantas transgênicas (BASNAYAKE et al., 2011; TAPARIA et al., 2012). Marcano et al. (2002) corroboram esta ideia, afirmando que um dos benefícios da embriogênese para a cana-de-açúcar é a introdução de genes de interesse, através da produção massiva de embriões utilizados para a transformação, além da produção de sementes sintéticas.

Vários trabalhos já foram relatados para ES em cana-de-açúcar, seja através de padrões diretos (WATT et al., 2009; SNYMAN et al., 2011), indiretos (MITTAL et al., 2009; KAUR e GOSAL, 2009), ou através da comparação dos dois padrões (SUPRASANNA et al., 2010; VAN DER VYVER, 2010). Na ESI, a produção dos calos é aplicada na engenharia genética (VAN DER VYVER, 2010; BASNAYAKE et al., 2011), conservação de germoplasma (CHEN et al., 1988), indução de mutagênese (KHAN e KHAN, 2010; KOCH et al., 2012) e micropropagação (SNYMAN et al., 2001). Van Der Vyver (2010) estudou o processo de transformação

e regeneração de plantas pelo método do bombardeamento de partículas, utilizando embriões de cana-de-açúcar produzidos via ESD e ESI, e obteve sucesso para a regeneração de plantas pelas duas vias, expressando o gene repórter GFP (*green fluorescent protein*).

Nos últimos anos tem-se trabalhado muito com a obtenção de plantas transgênicas para conferir resistência a herbicidas (FALCO et al., 2000; MANICKAVASAGAM et al., 2004), insetos (ARENCEBIA et al., 1997), vírus do mosaico (INGELBRECHT et al., 1999; BUTTERFIELD et al., 2002) e estresse hídrico (ZHANG et al., 1999; MOLINARI et al., 2007). As primeiras plantas geneticamente transformadas de cana-de-açúcar foram conseguidas através da biobalística (BOWER e BIRCH, 1992), utilizando o gene *nptII*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II, que confere resistência a canamicina e geneticina (MOLINARI et al., 2007).

Apesar das vantagens apresentadas, ainda são muitas as limitações para aplicação da técnica de ES. Mesmo tendo sido aplicada a muitas espécies, os mecanismos moleculares que permitem a formação destes embriões ainda não são bem compreendidos (CANHOTO, 2010). Outras limitações da ES passam pela germinação precoce, o elevado número de embriões anômalos, a falta de sincronização das fases durante o desenvolvimento dos embriões, a ocorrência de variação somaclonal e as baixas taxas de conversão (CORREIA, 2010). Portanto, protocolos de indução e regeneração de plantas bem definidos e otimizados para a cana-de-açúcar são muito importantes.

2.5. Aclimatização

As plantas cultivadas *in vitro* são expostas continuamente a um microambiente único, em recipientes fechados, sob condições assépticas, meio de cultura com alto teor de açúcar e nutrientes, baixa luminosidade e alto nível de umidade relativa. Tais fatores alteram algumas características morfofisiológicas das plantas, tais como o parênquima paliçádico pouco desenvolvido e excessivos espaços intercelulares (WETZSTEIN e SOMMER, 1982), mau funcionamento estomático (APÓSTOLO et al., 2005), redução do teor de cera epicuticular e anormalidades na cutícula (HARAZIKA, 2003), o que dificulta a regulação da perda

de água durante a transferência para as condições *ex vitro* (APÓSTOLO et al., 2005), acarretando, por conseguinte, no aumento nas taxas de mortalidade.

Durante a transferência para o ambiente *ex vitro*, a ação sinérgica da alta densidade de fluxo de fótons e o estresse hídrico reduz a capacidade do sistema fotossintético de utilizar a radiação incidente, causando o estresse oxidativo. Este se dá pela formação excessiva de ROS, incluindo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}). São espécies altamente reativas e podem perturbar seriamente o metabolismo normal, através de dano oxidativo aos lipídios de membrana, pigmentos, proteínas e ácidos nucleicos e, finalmente, resultar em morte celular (DEMIDCHIK, 2015). Para combater o dano oxidativo, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidante que envolve metabólitos enzimáticos e não enzimáticos (BAŤKOVÁ et al., 2008; JAHAN e ANIS, 2014). As enzimas antioxidantes estão presentes em diferentes compartimentos celulares e dentre elas destacam-se a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11). Entre os metabólitos antioxidantes não enzimáticos estão o ácido ascórbico (AsA), a glutathiona (GSH), o α -tocoferol e os carotenoides (PERVEEN et al., 2013; BARBOSA et al., 2014).

A SOD é considerada como a primeira linha de defesa contra as ROS e que catalisam a dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$, gerando H_2O_2 e O_2 , e pode ser encontrada em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (BHATTACHARJEE, 2010). Já a eliminação do H_2O_2 pode ser feita pelas enzimas CAT e APX. A atividade da CAT ocorre em concentrações relativamente altas de H_2O_2 (mM), especialmente em condições de estresse severo (DUBEY, 2011), enquanto a APX tem alta afinidade com o H_2O_2 , eliminando-o mesmo em baixas concentrações (μ M) (SHARMA et al., 2012). A CAT atua nos peroxissomos e glioxissomos, podendo ser encontrada também em mitocôndrias, de forma a converter moléculas de H_2O_2 a H_2O e O_2 (DUBEY, 2011). A APX pode ser encontrada no citosol, mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos e parede celular (DABROWSKA et al., 2007).

O conteúdo de antioxidantes não enzimáticos, bem como a atividade das enzimas antioxidantes formados durante o cultivo *in vitro* são muito importantes para o processo de transferência *ex vitro* (BAŤKOVÁ et al., 2008). Não menos importantes são as modificações destes componentes do sistema de defesa antioxidante ocorridas durante o processo de aclimatização, contudo, o

conhecimento acerca destas mudanças ainda é escasso. Ahmed e Anis (2014) observaram um aumento nas enzimas SOD, CAT, APX e GR (glutathiona redutase), bem como no teor de pigmentos fotossintéticos, ao longo dos 28 dias de aclimatização de *Cassia alata*, inferindo que tais modificações refletiram na sobrevivência das plantas.

Outros procedimentos vêm sendo utilizados para facilitar a transferência bem sucedida de plantas *in vitro* para a condição *ex vitro*, tais como o aumento na densidade de fluxo de fótons nas salas de crescimento e o uso de sistemas de ventilação que promovem o aumento das trocas gasosas entre os frascos de cultivo e o ambiente (HAZARIKA, 2003). O aumento no fluxo de fótons promove o desenvolvimento de tecidos fotossintetizantes (SERRET e TRILLAS, 2000), aumenta as taxas de fotossíntese (KOZAI e SMITH, 1995), e, portanto, as taxas de crescimento (CUI et al., 2000). Já o aumento da ventilação no interior dos frascos, promove o desenvolvimento de mudas com características fisiológicas e anatômicas semelhantes às observadas em plantas que são produzidas sob condições de campo (ALVAREZ et al., 2013). Estudando o efeito de três microambientes *in vitro* (condições foto autotróficas, fotomixotróficas e heterotróficas) sobre a aclimatização de *Doritaenopsis*, Shin et al. (2014) sugeriram que, tanto o crescimento quanto a sobrevivência das plantas durante o processo de transferência para o ambiente *ex vitro* podem ser otimizados pela suplementação com CO₂ e o aumento dos níveis de luz durante o cultivo *in vitro*.

2.6. Diodos emissores de luz (LEDs) no cultivo *in vitro* de plantas

A quantidade (densidade de fluxo de fótons) e a qualidade (comprimento de onda) da luz, absorvidas através de fotorreceptores, são de extrema importância para a regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (JIE et al., 2003), podendo modificar, dentre outras características, a espessura foliar, diferenciação do mesofilo, desenvolvimento vascular, desenvolvimento dos estômatos e biossíntese de metabólitos secundários (CASSANA et al., 2008; NHUT et al., 2015).

Nos últimos anos, inúmeras pesquisas têm estudado e recomendado a utilização de LEDs como uma fonte alternativa de luz para a cultura de tecidos. O LED apresenta as seguintes vantagens: economia de energia elétrica, baixa geração de calor, elevada eficiência de luz, longo período de vida, especificidade no

comprimento de onda e pouca massa e volume (YEH e CHUNG, 2009). O LED consiste na tecnologia mais moderna de iluminação existente no mercado, desde a sua invenção, em 1963, por Nick Holonyac, e continua em constantemente aperfeiçoamento (OLIVEIRA et al., 2011). A cor da luz que emitem está relacionada com o comprimento de onda, sendo os LEDs azuis, verdes e vermelhos os mais comuns no mercado. Esse conhecimento é importante, pois a eficiência fotossintética também depende do(s) comprimentoo(s) de onda emitido(s) (Figura 3) (OLIVEIRA et al., 2011).

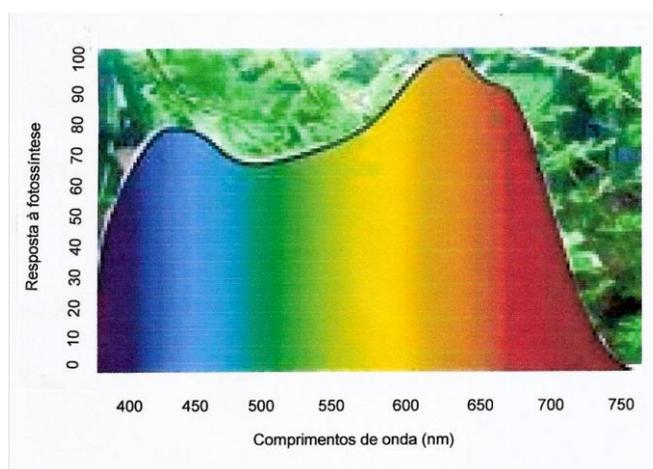


Figura 3- Porcentagem de resposta de tecidos vegetais à fotossíntese em função do comprimento de onda da luz recebida. Fonte: Oliveira et al. (2011).

As lâmpadas LED podem chegar a 100 mil horas de uso, tendo eficiência energética de 50%, enquanto as lâmpadas fluorescentes brancas, comumente utilizadas nas salas de crescimento, têm vida útil média de oito mil horas e eficiência energética de 20%, sendo expressiva a diferença proporcionada no custo de produção (YEH e CHUNG, 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, os LEDs são livres de substâncias tóxicas, como o mercúrio (ROCHA et al., 2010). A luz requerida para a fotossíntese compreende comprimentos de onda entre 400 e 700 nm (SEABROOK, 2005) e os LEDs azuis, verdes e vermelhos apresentam picos de comprimentos de onda, respectivamente, de 450, 565 e 660 nm, proporcionando melhor desenvolvimento das plantas (YEH e CHUNG, 2009). Em relação ao fluxo de fótons ideal para a fotossíntese, ocorre uma variação de 20 a 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dependendo da espécie vegetal (YEH e CHUNG, 2009; ROCHA et al., 2010). A intensidade do fluxo de fótons depende do número de LEDs instalados por unidade de área, e a quantidade de luz emitida depende do tipo de LED, havendo os de alto

brilho e os comuns, além daqueles de diferentes potências (1, 2 e 3 W). Existem ainda as diferenças no comprimento de onda do LED utilizado, por exemplo, os vermelhos emitem maior quantidade de luz do que os azuis (OLIVEIRA et al., 2011).

Os LEDs podem melhorar o desenvolvimento de brotos, se escolhido o comprimento de onda adequado para a fotossíntese (ROCHA et al., 2010). Para Taiz e Zeiger (2013), a menor eficiência de multiplicação e crescimento das plantas na presença de lâmpadas fluorescentes brancas é decorrente do fato destas emitirem diferentes comprimentos de onda entre 350 e 750nm, quando aqueles entre 400 e 700nm são importantes para a fotossíntese. Gradativamente, os LEDs tendem a substituir as lâmpadas fluorescentes nos laboratórios de micropropagação, em razão de proporcionarem maior e melhor desenvolvimento de plantas, com menor custo de produção (OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos sobre a qualidade da luz dos LEDs já foram realizados em crisântemo (SILVA e DEBERGH, 1997; KIM et al., 2004), bananeira (DUONG et al., 2002), copo-de-leite (CHANG et al., 2003), orquídea *Cymbidium* (HUAN e TANAKA, 2004) e morango (ROCHA et al., 2010), buscando-se aperfeiçoar as técnicas de micropropagação e as condições de cultivo para obtenção de mudas de melhor qualidade a valores mais competitivos.

A luz vermelha emite um espectro próximo ao da absorvância máxima das clorofilas e fitocromos, que é importante para o desenvolvimento do aparato fotossintético e para a acumulação de amido (SAEBO et al., 1995; ROCHA et al., 2013) e ainda vem sendo considerada como um estimulante para o comprimento das brotações e promoção do alongamento das células em espécies vegetais (FOLTA e MURUHNICHI, 2007). A luz azul desempenha um papel importante na síntese de clorofila, desenvolvimento do cloroplasto, abertura de estômatos e fotomorfogênese (OLIVEIRA et al., 2012).

As espécies respondem de forma diferente à iluminação do ambiente de cultivo, por isso a diversidade de resultados observados na literatura (SYLVANIA, 2000). Maior comprimento de brotação em crisântemos (*Chrysanthemum* sp.) (KIM et al., 2004) e em cana-de-açúcar (ROCHA et al., 2013) foi obtido sob LED vermelho, enquanto para copo-de-leite (*Zantedeschia albomaculata*) foi obtido sob LED azul (CHANG et al., 2003). Em morango, os LEDs vermelho e verde foram a fonte de luz que promoveu maior número de brotações por explante (ROCHA et al., 2010), já em cana-de-açúcar, uma menor taxa de multiplicação foi observada com o

uso do LED vermelho (ROCHA et al., 2013). Quanto ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos, observou-se maior quantidade de clorofila *a*, *b* e carotenoides nas brotações de morangueiro cultivadas sob LED vermelho (ROCHA et al., 2010). Em relação à aclimatização, as plantas provenientes do cultivo *in vitro* com LEDs são mais vigorosas (OLIVEIRA et al., 2012), conforme demonstrado em cana-de-açúcar (RB872552) com o uso de LED vermelho (ROCHA et al., 2013).

No que diz respeito à formação de calos e indução da embriogênese somática, ainda são poucos os estudos que tratam sobre o efeito do uso de LEDs. Em *Panax vietnamensis*, o LED amarelo foi considerado o melhor tratamento para o crescimento de calos, proporcionando maior peso fresco e seco, sendo também observada melhoria no crescimento destes quando mantidos sob LED 60% vermelho + 40% azul (NHUT et al., 2015). Huan e Tanaka (2004) relataram que o espectro composto por LEDs vermelhos e azuis foi ideal para a proliferação de calos e formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) de *Cymbidium*, enquanto que, em *Oncidium*, a combinação de LED vermelho-longo com LED vermelho ou azul promoveu o desenvolvimento de ESPs a partir de calos embriogênicos (CHUNG et al., 2010). Em cana-de-açúcar, o efeito dos LEDs foi estudado apenas para a formação de brotações e sobre parâmetros de crescimento de plantas cultivadas *in vitro*, não havendo relatos a respeito da indução de embriogênese somática.

3. Referências

- AHLOOWALIA, B. S.; MARETZKI, A. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 21-25, 1983.
- AHMED, M. R.; ANIS, M. Changes in activity of antioxidant enzymes and photosynthetic machinery during acclimatization of micropropagated *Cassia alata* L. plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 50, p. 601-609, 2014.
- ALCANTARA, G. B. et al. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 1, p. 63-72, 2014.
- ALENCAR, K. **Análise do balanço entre demanda por etanol e oferta de cana-de-açúcar no Brasil**. 2012. 49 f. Dissertação (Mestre em Agroenergia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ALI M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Effects of light intensities on antioxidant enzymes and malondialdehyde content during short-term acclimatization on micropropagated *Phalaenopsis* plantlet. **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, p. 109-120, 2005.
- ALVAREZ, C. et al. Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 110, p. 93-101, 2013.
- ALVAREZ, R. et al. Melhoramento da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 42, n. 3, p. 27-36, 1983.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa, 2002. 16 p.
- APÓSTOLO, N.; BRUTTI, C.; LLORENTE, B. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In Vitro Cell Dev Biol**, v. 41, p. 307-313, 2005.
- ARENCIBIA, A. et al. Transgenic sugarcane plants resistant to stemborer attack. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 247-255, 1997.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BASNAYAKE, S. W. V.; MOYLE, R.; BIRCH, R. G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 439-448, 2011.
- BAŤKOVÁ, P.; POSPISILOVA, J.; SYNKOVA, H. Production of reactive oxygen and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. **Biol. Plant**, v. 52, p. 413-422, 2008.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. Cap. 1, p.1-30.

BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. **Plant Tissue Culture: An Introductory Text**. India: Springer, 2013. 309 p.

BLANCO, M. D. A. et al. Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp). **Plant Cell Tiss. Organ Cult**, v. 51, p. 153-158, 1997.

BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 409-416, 1992.

BURRIEZA, H. P. et al. Accumulation pattern of dehydrins during sugarcane (var. SP80.3280) somatic embryogenesis. **Plant Cell Rep**, v. 31, p. 2139-2149, 2012.

BUTTERFIELD, M. K. et al. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 797-803, 2002.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia Vegetal: da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. 1ª ed. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2010. 407 p.

CARVALHO, J. M. F. C. et al. **Embriogênese somática**. Documentos 152. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006, 35 p.

CASSANA, F. F. et al. Atividade fotoquímica máxima do fotossistema II em plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 14, p. 46-51, 2008.

CHANDRAN, K. In Vitro Regeneration of *Saccharum edule* from immature inflorescence. **Sugar Tech**, v. 19, p. 170-173, 2011.

CHANG, H. S. et al. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, New York, v. 39, n. 2, p. 129-134, 2003.

CHAPLA, P. I. et al. pH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* LINDL. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2009.

CHEN, W. H. et al. Control and maintenance of plant-regeneration in sugarcane callus cultures. **J. Exp. Bot**, v. 39, p. 251-261, 1988.

CHENGALRAYAN, K.; ABOUZID, A.; GALLO-MEAGHER, M. In vitro regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 4, p. 477-482, july/aug. 2005.

CHUNG, J. P.; HUANG, C. Y.; DAI, T. E. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 511-516, 2010.

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

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: Embrapa, 2010. p. 51-56.

CIDADE, D. A. P. et al. In vitro morphogenesis of Brazilian sugarcane varieties. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar - safra 2015/2016**. Brasília, 2015. v. 2, n. 1, 28 p.

CORREIA, A. E. C. **Análise de substâncias de reserva em embriões zigóticos e somáticos de feijoa e de tamarilho - otimização da embriogênese somática**. 2010. Dissertação (Departamento Ciências da Vida) - Universidade de Coimbra, Portugal.

COSTA, F. H. S. et al. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 41-46, 2007.

CUI, Y. et al. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 62, p. 219-226, 2000.

DABROWSKA, G. et al. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 49, n. 1, p. 7-17, 2007.

DE JESUS, F. A. **Transformação genética de cana-de-açúcar com os genes da aquaporina SspTIP1;1 e SspPIP1;4**. 2010. 55 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, São Paulo.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environ Exp Bot**, v. 109, p. 2012-2228, 2015.

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

DIBAX, R. et al. Protocol optimization and histological analysis of *in vitro* plant regeneration of 'RB92579' and 'RB93509' sugarcane cultivars. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 1, p. 49-54, 2013.

DILLON, S. L. et al. Domestication to crop improvement: genetic resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae). **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 5, p. 975-989, 2007.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. cap. 9, p.178-203.

DUONG, T. N. et al. Growth of banana plantlets cultured in vitro under red and blue light-emitting diode (LED) irradiation source. **Acta Horticulturae**, v. 575, p. 117-124, 2002.

FAISAL, M.; ANIS, M. Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during ex vitro establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.99, p. 125-132, 2009.

FALCO, M. C.; NETO, A. T.; ULIAN, E. C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1188-1194, 2000.

FEHÉR, A. et al. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, v. 51, n. 1, p. 5-12, 2002.

FOLTA, K. M.; MURUHNICHI, S. A. Green light: a signal to slow down or stop. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 12, p. 3099-3111, 2007.

FRANKLIN, G. et al. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids) midrib segment explants. **Plant Growth Regulation**, v. 50, p. 111-119, 2006.

FREITAS, E. O. **Embriogênese somática e análises morfoanatómicas e por citometria de fluxo em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.)**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestre em Ciências Florestais) - Universidade de Brasília, Faculdade de tecnologia, Brasília.

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

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

GANDONOU, C. et al. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 1250-1255, 2005.

GARCIA, R. et al. In vitro morphogenesis patterns from shoot apices of sugar cane are determined by light and type of growth regulator. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 90, n. 2, p. 181-190, 2007.

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

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

GILL, R.; MALHTRA, P. K.; GOSAL, S. S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 227-231, 2006.

GRIVET, L. et al. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 2, p. 9-17, 2004.

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

GUEYE, B. et al. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 99, p. 35-45, 2009.

GUPTA S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnol Reports**, v. 7, p. 211-220, 2013.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant Propagation: principles and practices**. Prentice hall, 2002. 7. ed., p. 639-643.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. Review Articles. **Current Science**, v. 85, n. 12, 2003.

HEERDT, E. **Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar**. 2008. 4-7 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

HELLER-USZYNSKA, K. et al. Diversity arrays technology effectively reveals DNA polymorphism in a large and complex genome of sugarcane. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 28, n. 1, p. 37-55, 2011.

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

HOY, J. W. et al. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. **Euphytica**, v. 129, p. 237-240, 2003.

HUAN, L. V. T.; TANAKA, M. Effects of red and blue light-emitting diodes on callus induction, callus proliferation, and protocorm-like body formation from callus in *Cymbidium* orchid. **Environment Control in Biology**, v. 42, p. 57-64, 2004.

INGELBRECHT, I. L.; IRVINE, J. E.; MIRKOV, T. E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploidy genome. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n. 4, p. 1187-1198, 1999.

JAHAN, A.; ANIS, M. Relative examination of antioxidative enzymatic activities in plantlets of *Cardiospermum halicacabum* L. differentiated from hypocotyls in in vivo and ex vitro environment. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 66-72, 2014.

JIE, Q. Y. et al. Light intensity and spectral quality influencing the callus growth of *Cistanche deserticola* and biosynthesis of phenylethanoid glycosides. **Plant Sci**, v. 165, p. 657-661, 2003.

JIMENEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.

JOYCE, P. et al. Selection system and cocultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. **Plant Cellular Reports, Berlin**, v. 29, n. 2, p. 173-183, 2010.

KAUR, A.; GOSAL. Desiccation of callus enhances somatic embryogenesis and subsequent shoot regeneration in sugarcane. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 332-334, 2009.

KHAN, S. A. et al. Rapid micropropagation of three elite sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. **African Journal Biotechnology**, v. 7, p. 2147-2180, 2008.

KHAN, S. J.; KHAN, M. A. Applications of in vitro mutation techniques for sugarcane improvement. **Journal of Agricultural Research**, v. 48, p. 429-435, 2010.

KIM, S. J. et al. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 101, p. 143-151, 2004.

KOCH, A. C. et al. An in vitro mutagenesis protocol for the production of sugarcane tolerant to the herbicide Imazapyr. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 48, p. 417-427, 2012.

KOZAI, T.; SMITH, M. Environmental control in plant tissue culture. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Kluwer: Netherlands, 1995. P. 301-318.

LAKSHMANAN, P. et al. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Rep**, Berlin, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, 2006.

LEE, T. S. G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 10, p. 47-55, 1987.

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

LIU, M. C. Factors affecting induction, somatic embryogenesis and plant-regeneration of callus from cultured immature inflorescences of sugarcane. **J. Plant Physiol**, v. 141, p. 714-720, 1993.

LIU, M. C. Sugarcane. In: SHARP, W. R., et al. **Handbook of Plant Cell Culture**. New York: Macmillan Publishing, v. 2, 1984. p. 572-605.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. An introduction to plant cell culture protocols: back to the future. In: _____. **Plant cell culture - methods in molecular biology**. 2. ed. New Jersey: Humana, 2006. p. 411.

MACEDO, A. F. Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

MANICKAVASAGAM, M. et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, v. 23, n. 3, p. 134-143, 2004.

MARCANO, A. K. et al. Optimización del proceso de embriogénesis somática em variedades vénézoelanas de caña de azúcar. **Revista Acta Científica Vénézoelana**, v. 53, p. 1-24, 2002.

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

MARSONI, M. et al. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. **Plant Cell Rep**, v. 27, p. 347-356, 2008.

MELO, E. F. **Embriogênese somática em cana-de-açúcar e aspectos morfoanatômicos**. 2011. 62 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MENEZES, T. S. A. et al. Embriogênese somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **GEINTEC**, São Cristóvão, v. 2, n. 1, p. 32-41, 2012.

MITTAL, P. et al. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in Sugarcane. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 15, p. 257-265, 2009.

MOLINARI, H. B. C. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218, 2007.

MUDRY, C. S. et al. Embriogênese somática da cultivar RB966928 e do clone RB986419 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1023-1032, 2013.

MUDRY, C. S. **Otimização de protocolos de indução da embriogênese somática em cultivares de cana-de-açúcar (*saccharum* spp.)**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Paraná.

MULEO, R.; MORINI, S. Light quality regulates shoot cluster growth and development of MN 106 apple genotype in vitro culture. **Sci. Hortic.** v. 108, p. 364-370, 2006.

NAWAZ, M. et al. Improving in vitro leaf disk regeneration system of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) with concurrent shoot/root induction from somatic embryos. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, p. 726-732, 2013.

NIEVES, N. et al. Biochemical characterization of embryogenic and nonembryogenic calluses of sugarcane. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 39, n. 3, p. 343-345, 2003.

NHUT, D. T. et al. Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 73, p. 43-52, 2003.

NHUT, D. T. et al. Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, London, v. 29, n. 2, p. 299-308, 2015.

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

NOGUEIRA, G. F. **Regeneração, conservação in vitro e estabilidade genômica em cana-de-açúcar**. 2013. 184 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, R. P.; ROCHA, P. S. G.; SCIVITTANO, W. B. **Estruturação de Sistema de LEDs em Laboratório de Cultura de Tecidos**. Pelotas: Embrapa, 2011. V. 121, p. 1-6.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; ROCHA, P. S. G. Menos consumo de energia, mais eficiência. **A lavoura**, n. 691, p. 30-32, 2012.

OSÓRIO, M. L. et al. Morphological, physiological and oxidative stress markers during acclimatization and field transfers of micropropagated *Tuberaria major* plants. **Plant Cellular Tissue and Organ Culture**, v. 115, p. 85-97, 2013.

PASTERNAK, T. et al. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, v. 57, p. 5-12, 2002.

PATHAK, S. et al. Effect of growth regulators on in vitro multiplication and rooting of shoot cultures in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 11, p. 86-88, 2009.

PERVEEN, S.; ANIS, M.; AREF, I. M. Lipid peroxidation, H₂O₂ content, and antioxidants during acclimatization of *Abrus precatorius* to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 57, n. 3, p. 417-424, 2013.

RAMOS, R. S. **Efeito de reguladores de crescimento na embriogênese somática de cana-de-açúcar**. 2011. 52 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

RASCHID, H.; QURAIISHI, A. High frequency embryogenic callus induction and its regeneration in three wheat cultivars. In: MUJEEB-KAZI, A.; SITCH, L. A. **Review of advances in plant biotechnology**. Mexico: 2nd International Symposium on Genetic Manipulation in crops, 1989. p. 205-215.

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. **Naturwissenschaften**, v. 45, p. 344-345, 1958.

RIDESA. Rede Interuniversitária para o desenvolvimento do setor sucroenergético - RIDESA, 19 Novembro 2014. Disponível em: <<http://www.ridesa.agro.ufg.br/>>. Acesso em: 01 Junho 2015.

ROCHA, D. I. et al. Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, n. 1, p. 69-78, oct. 2012.

ROCHA, P. S. G. et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1922-1928, 2010.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Sugarcane micropropagation using light emitting diodes and adjustment in growth-medium sucrose concentration. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 7, p. 1168-1173, 2013.

SAEBO, A.; KREKLING, T. E.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 41, p. 177-185. 1995.

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

SEABROOK, J. E. Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: a review. **American Journal of Potato Research**, New York, v. 82, p. 353-367, 2005.

SERRET, M.; TRILLAS, M. Effects of light and sucrose levels on the anatomy. Ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultures *in vitro*. **Int J Plant Sci**, v. 161, p. 281-289, 2000.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHIN, K.; PARK, S.; PAEK, K. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different microenvironments *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 26-33, 2014.

SILVA, M. H. M.; DEBERGH, P. C. The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalli* (Wats.) Feer. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 51, p. 187-193, 1997.

SILVA, M. M. A. Embriogênese somática direta e indireta em cana-de-açúcar: busca de correlações com o estresse *in vitro*. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA M, M. A. et al. Antioxidant enzymes activity in embryogenic and non-embryogenic tissues in sugarcane. **Acta Biologica Colombiana**, v. 19, p. 203-210, 2014.

SILVEIRA, V. et al. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 114, p. 351-364, 2013.

SNYMAN, S. J. et al. A comparison of direct and indirect somatic morphogenesis for the production of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Acta Horticulturae**, v. 560, p. 105-108, 2001.

SNYMAN, S. J. et al. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 47, p. 234-249, 2011.

SNYMAN, S. J. et al. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1016-1023, 2006.

STEINER, N. et al. *Areucaria angustifolia* Biotechnology-Review. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, p. 20-28, 2008.

STEWART, F.; MAPES, M.; SMITH, J. Growth and organized development of cultured cells. I. growth and division of freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 693-703, 1958.

SUGIMOTO, K.; GORDON, S. P.; MEYEROWITZ, E. M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? **Trends in Cell Biology**, v. 21, p. 212-218, 2011.

SUPRASANNA, P. et al. Profiling of culture-induced variation in sugarcane plants regenerated via direct and indirect somatic embryogenesis by using transposon-insertion polymorphism. **Sugar Technology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 26-30, 2010.

SYLVANIA, O. Light and plants. Danvers: Osram Sylvania, 2000. Vol. 1, p. 5.

TAHIR, M.; STASOLLA, C. Shoot apical development during *in vitro* embryogenesis. **Canadian Journal of Botany**, v. 84, p. 1650-1659, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 819 p.

TAPARIA, Y.; GALLO, M.; ALTPETER, F. Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 111, p. 131-141, 2012.

TAYLOR, P. W. J. et al. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 69-78, 1992.

TERZI, M.; LO-SCHIAVO, F. Somatic embryogenesis. In: BHOJWANI. **Plant tissue culture: applications and limitations**. The Netherlands: Elsevier, 1990. p. 54-66.

TIEL, K. et al. Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. **Biotecnología Aplicada**, v. 23, n. 1, p. 22-24, 2006.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, v. 1, 1998. 509 p.

VAN DER VYVER, C. Genetic transformation of the euploid *Saccharum officinarum* via direct and indirect embryogenesis. **Sugar Tech**, v. 12, p. 21-25, 2010.

VETTORE, A. L. et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v. 13, p. 2725-2735, 2003.

VIEIRA, L. N. et al. Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) 'Nanicão Corupá' *in vitro* plantlets. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v. 27, p. 91-97, 2015.

VIÑAS, M.; JIMÉNEZ, V. M. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (*Arecaceae*). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 2, p. 229-242, 2011.

WAMAITHA, M. J. et al. Thidiazuron-induced rapid shoot regeneration via embryo-like structure formation from shoot tip-derived callus culture of Sugarcane. **Plant Biotechnology**, v. 27, p. 365-368, 2010.

WATT, M. P. et al. *In vitro* minimal growth storage of *Saccharum* spp. hybrid (genotype 88H0019) at two stages of direct somatic embryogenic regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 263-271, 2009.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* (*Hamamelidaceae*) during acclimatization. **Am J Bot**, v. 69, p. 1579-1586, 1982.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs - energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 8, p. 2175-2180, 2009.

ZHANG, J.; NGUYEN, H. T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 291-302, 1999.

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

CAPÍTULO II

USO DA ILUMINAÇÃO POR LEDs NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E SEU
EFEITO NA ACLIMATIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Uso da iluminação por LEDs na embriogênese somática e seu efeito na aclimatização de cana-de-açúcar

Lais Tomaz Ferreira¹, Marina Medeiros de Araújo Silva², Lilia Willadino¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife-PE.

² Instituto Nacional do Semiárido - Insa/MCTI, Campina Grande-PB.

Resumo Objetivou-se avaliar o uso de LEDs na indução da embriogênese somática (ES), formação de brotações e enraizamento da cana-de-açúcar (RB98710) e seu efeito na aclimatização. O meio de Murashige e Skoog (MS) foi utilizado em todas as etapas, sendo suplementado com 9 μM de 2,4-D + 1,1 μM de BAP (C1) e 13,6 μM de 2,4-D + 2,2 μM de BAP (C2) para a indução da ES; isento de fitorreguladores para a regeneração de plantas; acrescido de 4,44 μM de BAP + 4,65 μM de KIN para a indução de brotações e de 5,37 μM de ANA para o enraizamento. Durante a realização das etapas *in vitro*, os cultivos foram mantidos sob iluminação fluorescente (FL) e LEDs. O uso de LEDs favoreceu a formação de calos, contudo, a regeneração de plantas foi superior com o uso da iluminação FL. Análises histológicas revelaram a formação de embriões somáticos pela via direta e indireta. As plantas obtidas por ES e cultivadas sob LEDs apresentaram maior taxa de multiplicação ao longo de seis subcultivos (média de 1:5,06). Ambas as fontes de iluminação propiciaram o enraizamento das plantas e, antes da aclimatização, estas não diferiram quanto ao conteúdo de malondialdeído. Plantas mantidas sob FL exibiram maior atividade da SOD e CAT, enquanto as mantidas sob LEDs exibiram maior atividade da APX e teores mais elevados de carotenoides. Após 15 dias da aclimatização, a perda de água em plantas provenientes do cultivo *in vitro* com LEDs foi menor e a taxa de sobrevivência de 96% foi superior à obtida em plantas provenientes da FL (75%). As enzimas antioxidantes se mostraram eficientes no combate ao estresse oxidativo em plantas provenientes de ambos os sistemas de iluminação. Assim, o espectro emitido pelo LED não favoreceu a ES, contudo, mostrou-se superior no desenvolvimento e multiplicação das plantas obtidas, favorecendo o processo de aclimatização da variedade RB98710.

Palavras-chave *Saccharum* spp.; Qualidade da luz; Micropropagação; Sobrevivência *ex vitro*; Estresse oxidativo

Introdução

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, açúcar e álcool de cana do mundo, seguido de Índia e China. A produção da safra 2014/2015 de cana-de-açúcar foi de 634,8 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que representa um incremento de 3,1% em relação à safra anterior, numa área de aproximadamente 9 milhões de hectares (CONAB 2015). Nas últimas décadas, a capacidade da cultura de acumular grandes quantidades de biomassa e seus teores de sacarose destacou o seu potencial como importante matéria-prima para a produção de biocombustível, o que pode ajudar a mitigar a demanda global por energia sustentável (Arruda 2011; Taparia et al. 2012). Desse modo, seu destaque na indústria agrícola requer grandes esforços para a melhoria de seus caracteres agrônômicos (Nawaz et al. 2013).

O longo período juvenil e o alto grau de heterozigose apresentado pelos genótipos de cana-de-açúcar tornam-se obstáculos em programas de melhoramento genético tradicional, sendo a engenharia genética uma alternativa potencial para a obtenção de novas variedades (Alcantara et al. 2014). O sucesso da engenharia genética, no entanto, é dependente da técnica de cultura de tecidos para o estabelecimento de um sistema de regeneração *in vitro* (Khan et al. 2008; Arencibia et al. 2000). A embriogênese somática (ES) fornece material biológico que permite introduzir genes de interesse em células que, posteriormente, regenerarão plantas transformadas (Marcano et al. 2002). Para isso, é necessário o desenvolvimento de protocolos eficientes de indução e regeneração de plantas para as diferentes variedades de cana-de-açúcar, uma vez que a resposta morfogênica é bastante influenciada pelo genótipo (Joyce et al. 2010).

A indução da ES só é possível quando se utilizam células competentes e capazes de receber estímulos indutores apropriados, as quais podem ser geneticamente reprogramadas (Silveira et al. 2013). Reguladores de crescimento são usados para modular a competência embriogênica das células e permitir a progressão e maturação de embriões somáticos (Jimenez 2005). Diversos estudos relatam a embriogênese somática em cana-de-açúcar (Snyman et al. 2011), incluindo a produção de calos aplicada à engenharia genética (Van Der Vyver 2010; Basnayake et al. 2011) e à indução de mutagênese (Khan e Khan 2010; Koch et al. 2012). No entanto, muitos são os fatores que podem interferir na resposta embriogênica dos tecidos cultivados *in vitro* e tornar os protocolos mais eficientes e economicamente viáveis. Dentre os principais fatores estão o tipo de explante

utilizado, a composição do meio de cultura, os reguladores de crescimento, a temperatura e a luminosidade (Joyce et al. 2010).

O espectro luminoso exerce efeitos notáveis sobre a célula e o crescimento de tecidos vegetais, bem como sobre a biossíntese de metabólitos. Inúmeras pesquisas veem descrevendo as vantagens da utilização dos diodos emissores de luz (LEDs) como fonte de iluminação no cultivo *in vitro* de plantas. Distintos atributos morfológicos, anatômicos e fisiológicos, como a formação de brotações e embriões somáticos, rizogênese, modificações na anatomia foliar e melhoria nas habilidades fotossintéticas de plantas cultivadas *in vitro* podem ser regulados por propriedades espectrais dos LEDs (Gupta e Jatothu 2013; Liu et al. 2014; Nhut et al. 2015). Estes atributos acabam por influenciar também no desenvolvimento *ex vitro*, facilitando o processo de aclimatização (Nhut et al. 2003; Vieira et al. 2015).

A aclimatização é uma etapa crítica e, muitas vezes, limitante na micropropagação de plantas, devido ao estresse ocasionado pela transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. Durante a aclimatização, as condições de baixa a moderada umidade relativa, alto fornecimento de CO₂ e alta intensidade luminosa (Braga et al. 2011) podem induzir a foto-inibição e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são potencialmente danosas às biomoléculas. Para combater o dano oxidativo, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidativo, que envolve um grupo de enzimas entre as quais se destacam a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) (Batková et al. 2008). Alterações significativas na atividade enzimática antioxidante durante a aclimatização foram relatadas em *Phalaenopsis* (Ali et al. 2005), *Rauvolfia tetraphylla* (Faisal e Anis 2009) e *Cassia alata* (Ahmed e Anis 2014). Tais informações permitem uma melhor compreensão e otimização das condições ambientais durante esta fase, reduzindo a mortalidade das plantas e tornando a produção de mudas mais eficaz e economicamente viável.

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da utilização de LEDs sobre processos morfogênicos *in vitro*, no que concerne à embriogênese somática, a formação de brotações e o enraizamento na variedade RB98710 de cana-de-açúcar, bem como avaliar as alterações no metabolismo redox durante a aclimatização das plantas obtidas.

Material e Métodos

Indução da embriogênese somática

Foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), variedade RB98710, com quatro meses de aclimatização, procedentes da Biofábrica Governador Miguel Arraes, Recife, PE. As folhas mais externas foram retiradas e a região basal das folhas cortada em segmentos de 10 cm de comprimento, os quais foram lavados com detergente comercial e água corrente por 5 minutos, imersos em álcool 70% por 1 minuto e submetidos à assepsia com hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% por 20 minutos, seguiu-se uma tríplex lavagem em água estéril. Após o enxágue, os segmentos foram fracionados em porções de 1 cm de comprimento e 0,3 cm de diâmetro, sendo tal explante denominado de segmento de folhas imaturas. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige e Skoog 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e duas combinações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6-bezilaminopurina (BAP): C1- 9 µM de 2,4-D + 1,1 µM de BAP e C2 - 13,6 µM de 2,4-D + 2,2 µM de BAP. O meio foi gelificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Os explantes foram incubados em sala de crescimento, a 25 ± 2°C, onde permaneceram 7 dias no escuro e 23 dias sob fotoperíodo de 16 horas e duas diferentes fontes de iluminação. Após 30 dias, foram contabilizados os explantes responsivos e coletadas amostras para a realização de análises histológicas. Os calos/embriões formados foram transferidos para meio MS isento de reguladores de crescimento, onde permaneceram até a conversão em plantas. Após 45 dias, foi contabilizado o percentual de explantes regenerantes e o número de plantas formadas por explante regenerante.

Tratamentos de luz

Em todas as etapas realizadas *in vitro*, os cultivos foram mantidos em sala de crescimento sob duas diferentes fontes de luz: (1) FL- lâmpadas fluorescentes (100% branca) e (2) LED- diodos emissores de luz, modelo LabPAR: LL-HR/DB-01 (Lablumes[®]) (82% vermelha:18% azul). A intensidade luminosa foi de 50 µmol m⁻² s⁻¹ e 80 µmol m⁻² s⁻¹ para as FL e LED, respectivamente. O espectro de luz emitido pelas diferentes fontes de luz foi obtido utilizando o espectrógrafo Ocean Optics modelo USB2000 (Figura 1).

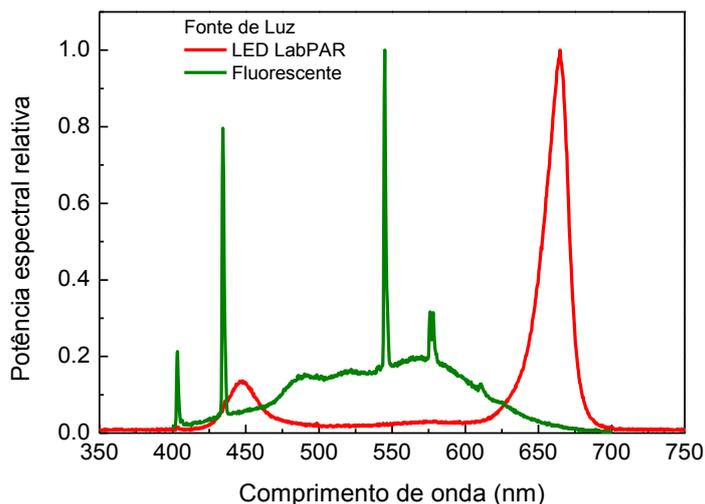


Figura 1 Distribuição espectral de energia relativa em lâmpadas fluorescentes brancas e LED LabPAR

Análise histológica

Amostras foram coletadas e fixadas em FAA 50 (formaldeído: ácido acético glacial: etanol 50%, na proporção de 1:1:8), desidratadas em série etanólica ascendente (70-100%) e infiltradas em parafina, de acordo com Johansen (1940). O material foi seccionado em micrótomo rotativo para a obtenção de cortes com 5 μm de espessura, os quais foram submetidos ao processo de coloração com safrablau (azul de astra e safranina) (Kraus e Arduin 1997). As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio Olympus CH30 e as imagens capturadas em câmera digital Sony.

Multiplicação e enraizamento das plantas obtidas por embriogênese somática

Plantas provenientes dos embriões somáticos foram inoculadas em meio MS líquido acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 4,44 μM de BAP e 4,65 μM de cinetina (KIN), com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Foram realizados seis subcultivos, em intervalos de 20 dias, para a obtenção da taxa de multiplicação (nº de brotos/ nº explantes inoculados). No sexto subcultivo, as brotações foram transferidas para o meio de enraizamento, composto por metade da concentração de sais de MS, líquido, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,37 μM de ácido naftalenoacético (ANA), onde permaneceram por 30 dias. Os cultivos foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura, luminosidade e fotoperíodo descritas anteriormente. Ao final do período de enraizamento foram realizadas

avaliações biométricas e bioquímicas, quantificação da perda de água em folhas e densidade estomática foliar.

Aclimatização

As plantas enraizadas foram lavadas em água corrente, para a remoção dos resíduos do meio de cultura, e transplantadas para bandejas de 98 células contendo substrato Plantmax[®]. As plantas permaneceram em casa de vegetação, sob temperatura e umidade relativa médias de 27°C e 80%, respectivamente, sendo irrigadas duas vezes ao dia, durante 15 dias. O teor de H₂O₂, a peroxidação lipídica, o conteúdo de proteínas solúveis e a atividade de enzimas antioxidantes foram obtidos aos 1, 3, 5 e 15 dias da aclimatização. A taxa de sobrevivência, as avaliações biométricas, a quantificação de perda de água em folhas, a densidade estomática e os teores de pigmentos fotossintéticos foram obtidos aos 15 dias de aclimatização.

Análises biométricas

Foram determinadas a altura da parte aérea, comprimento de raiz, número de folhas, massa de matéria fresca e seca da parte aérea e radicular, além do número de perfilhos formados.

Determinação do conteúdo de H₂O₂ e MDA

As plantas coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer (-20 °C) até o processamento das análises. Amostras de 0,2 g foram maceradas a frio em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugadas a 10.000g por 15 minutos, a 4°C. Posteriormente ao preparo do extrato, a determinação dos níveis de H₂O₂ foi realizada segundo protocolo descrito por Alexieva et al. (2001), enquanto a peroxidação lipídica foi determinada pela estimativa do teor de malondialdeído (MDA), substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBA), segundo a metodologia de Heath e Packer (1968).

Quantificação de proteínas e atividade de enzimas antioxidantes

Amostras de 0,2 g de tecido foliar foram homogeneizadas a frio em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 1% de polivinilpirrolidona (PVP) e 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a centrifugação a 10.000g e 4°C, durante 15 minutos, o extrato foi utilizado para a quantificação

espectrofotométrica do teor de proteínas solúveis totais, de acordo com Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A atividade de enzimas chave do metabolismo antioxidante foi determinada seguindo a metodologia de Berris e Sizer (1952) para a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e de Nakano e Assada (1981) para a ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11).

Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Para a determinação do teor de clorofila (chl *a* e *b*) e carotenoides, amostras de 0,2 g de folhas foram maceradas com acetona 80%. Após filtragem e centrifugação, o extrato obtido foi utilizado para a quantificação dos pigmentos em espectrofotômetro UV-visível, utilizando comprimentos de onda de 663 e 647 para clorofilas e 470 nm para carotenoides, de acordo com a metodologia de Lichtenthaler (1987).

Perda de água em folhas (PAF)

Utilizou-se a 3ª folha expandida de cinco plantas por tratamento, as quais foram pesadas em balança analítica imediatamente após a coleta, para a determinação da massa fresca inicial (MF_0), e em intervalos de 15 minutos (MF_t) até completar o tempo total de 75 minutos. A determinação foi realizada em laboratório, nas condições de 28°C e 48% de umidade relativa. Após as medidas de massa fresca, as folhas foram colocadas em estufa a 70°C por 48 h para a determinação da massa seca (MS). A PAF ao longo do tempo foi obtida segundo a equação proposta por Dami e Hughes (1995): $PAF (\%) = [(MF_0 - MS) - (MF_t - MS)] \times 100 / (MF_0 - MS)$.

Densidade estomática

O número de estômatos por mm^2 na superfície foliar adaxial e abaxial foi determinado pelo método de impressão epidérmica, utilizando éster de cianoacrilato (adesivo instantâneo universal). Após a secagem das lâminas, foram analisados, em microscópio (Olympus CH30), 15 campos obtidos da região mediana da segunda folha de plantas provenientes de cada um dos tratamentos de luz.

Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Dados obtidos por contagem foram transformados em $(x+1)^{0,5}$. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas

pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar (Ferreira 2011).

Resultados e Discussão

Indução da embriogênese somática

O maior percentual de explantes responsivos (70%) foi observado no tratamento C1, não havendo diferença significativa entre as fontes de iluminação utilizadas (Tabela 1). Em todos os tratamentos foi observada a formação de calos com coloração esbranquiçada (Figura 2), bem como de embriões somáticos diretamente do explante. Em cana-de-açúcar, muitos autores constataram que a resposta morfogênica varia, especialmente, com o genótipo e com o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento utilizados (Mudry et al. 2013; Nawaz et al. 2013; Alcantara et al. 2014; Silva et al. 2014). Alcantara et al. (2014) obtiveram melhores resultados utilizando o 2,4-D do que o ácido triclorofenoxiacético ou picloram, e ainda observaram que a associação de 2,4-D com BAP ou KIN não promoveu resposta favorável para as variedades RB855156 e RB72454. Por outro lado, o balanço auxina/citocinina (2,4-D/BAP) foi fundamental para a obtenção da ES direta na variedade RB872552 (Silva et al. 2014), confirmando a especificidade da resposta dos genótipos à ação dos reguladores de crescimento.

Tabela 1 Efeito da concentração de 2,4-D + BAP e do sistema de iluminação (LED e FL) na embriogênese somática da variedade RB98710

2,4-D + BAP (μ M)	Explantes responsivos (%)		Explantes regenerantes (%)		Nº de plantas/ explante regenerante	
	FL	LED	FL	LED	FL	LED
(C1) 9 + 1,1	40 aA	70 aA	45,5 aA	18,2 bB	4,75 aB	1,00 bA
(C2) 13,6 + 2,2	40 aA	30 aB	25,0 aA	50,0 aA	26,75 aA	1,25 bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula entre iluminação e letra maiúscula entre reguladores de crescimento não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Os explantes mantidos sob iluminação FL formaram calos apenas na extremidade basal, a partir de um prolongamento foliar (Figura 2A e B), enquanto aqueles expostos ao LED apresentaram calogênese em toda a sua extensão (Figura 2C e D). Pesquisas envolvendo o uso de diferentes fontes de luz na indução da ES ainda são escassas, mas estudos feitos com *Panax vietnamensis* demonstraram

melhor crescimento e peso fresco de calos quando utilizado o LED amarelo (Nhut et al. 2015). Em *Oncidium*, um maior número de embriões por calo foi obtido com a combinação entre LED vermelho, azul e vermelho distante (Chung et al. 2010).

O tipo de luz também influenciou na maturação dos embriões e, posteriormente, na regeneração das plantas. Muitos explantes responsivos oxidaram quando foram transferidos para meio sem reguladores de crescimento, especialmente aqueles mantidos sob LED. Desse modo, o maior número de plantas formadas foi obtido a partir de explantes cultivados no meio C2 sob iluminação FL, com média de 26,75 plantas/explante (Tabela 1; Figura 2E), enquanto os tratamentos mantidos sob LED apresentaram médias de 1,0 e 1,25 para C1 e C2, respectivamente (Figura 2F), demonstrando que o espectro do LED utilizado não foi efetivo para a regeneração do embrião somático em planta.

A baixa taxa de regeneração de plantas pode ter ocorrido pela alta produção de calos não embriogênicos, notadamente nos explantes cultivados com iluminação por LED.

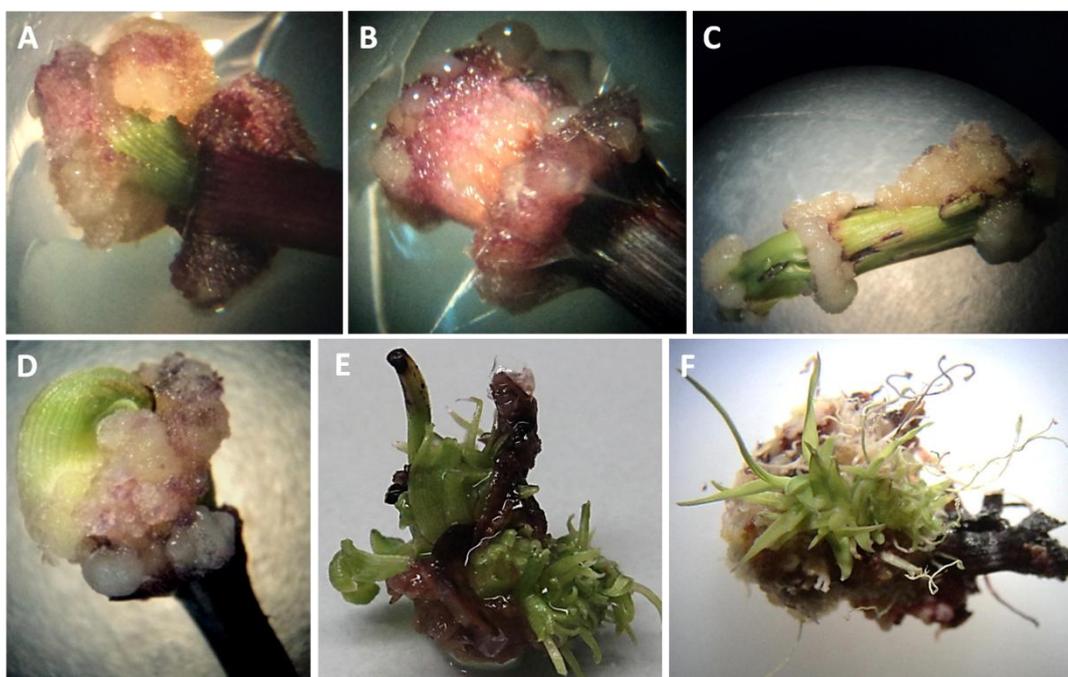


Figura 2 Influência da iluminação, 2,4-D e BAP na embriogênese somática da variedade RB98710. A) formação de calo no meio C1 sob FL; B) presença de calo/embrião no meio C2 sob FL; C) presença de calo por todo explante no meio C1 sob LED; D) presença do prolongamento foliar e calo na extremidade no meio C2 sob LED; E) regeneração de plantas sob FL; F) regeneração de plantas sob LED

A capacidade de produzir calos embriogênicos durante a ES tem sido descrita como uma resposta genótipo dependente (Snyman et al. 2011), contudo, tal capacidade também pode ser influenciada por fatores ambientais, como a qualidade da luz. Calos embriogênicos crescem mais rápido e formam plantas, enquanto os não embriogênicos não as formam, pois sua composição bioquímica entre outras coisas é diferente (Nieves et al. 2003). Neste sentido, o conhecimento sobre a morfologia celular, bem como alterações bioquímicas e moleculares podem ser importantes para a compreensão da aquisição de competência em tecidos embriogênicos (Silveira et al. 2013). Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, a expressão e a maturação de embriões de *Agave tequilana* foram alcançados com êxito quando estes foram expostos à luz vermelha (Rodríguez-Sahagún et al. 2011), enquanto em *P. vietnamensis* melhores resultados foram alcançados com o uso de LED na proporção 60% vermelho: 40% azul (Nhut et al. 2015). Outros autores verificaram maior percentual de regeneração em cana-de-açúcar quando o meio foi suplementado com BAP (Feitosa et al. 2013; Alcantara et al. 2014; Nawaz et al. 2013), KIN + BAP (Menezes et al. 2012) e carvão ativado (Silveira et al. 2013).

Análise histológica da embriogênese somática

A ocorrência das vias direta e indireta foi confirmada através de análises histológicas, indicando a formação de calos (Figura 3A) e embriões somáticos a partir de células parenquimáticas (Figura 3B e C) e epidérmicas (Figura 3D) do explante. Na Figura 3B pode-se observar a multiplicação de células do explante, a partir das quais ocorre a formação dos embriões somáticos. Regiões onde existem células com citoplasma denso, núcleo com nucléolo evidente e alta relação núcleo/citoplasma, indicam zonas meristemáticas que precedem a formação dos embriões somáticos (Figura 3D); enquanto as células não embriogênicas são maiores e com núcleos pequenos (Silveira et al. 2013). No presente estudo, os embriões somáticos se originaram do tecido do explante, e não apresentavam conexão vascular com o explante que lhes deu origem, caracterizando o embrião somático. Características semelhantes de células embriogênicas e não embriogênicas foram encontradas por Alcantara et al. (2014) e Silveira et al. (2013).

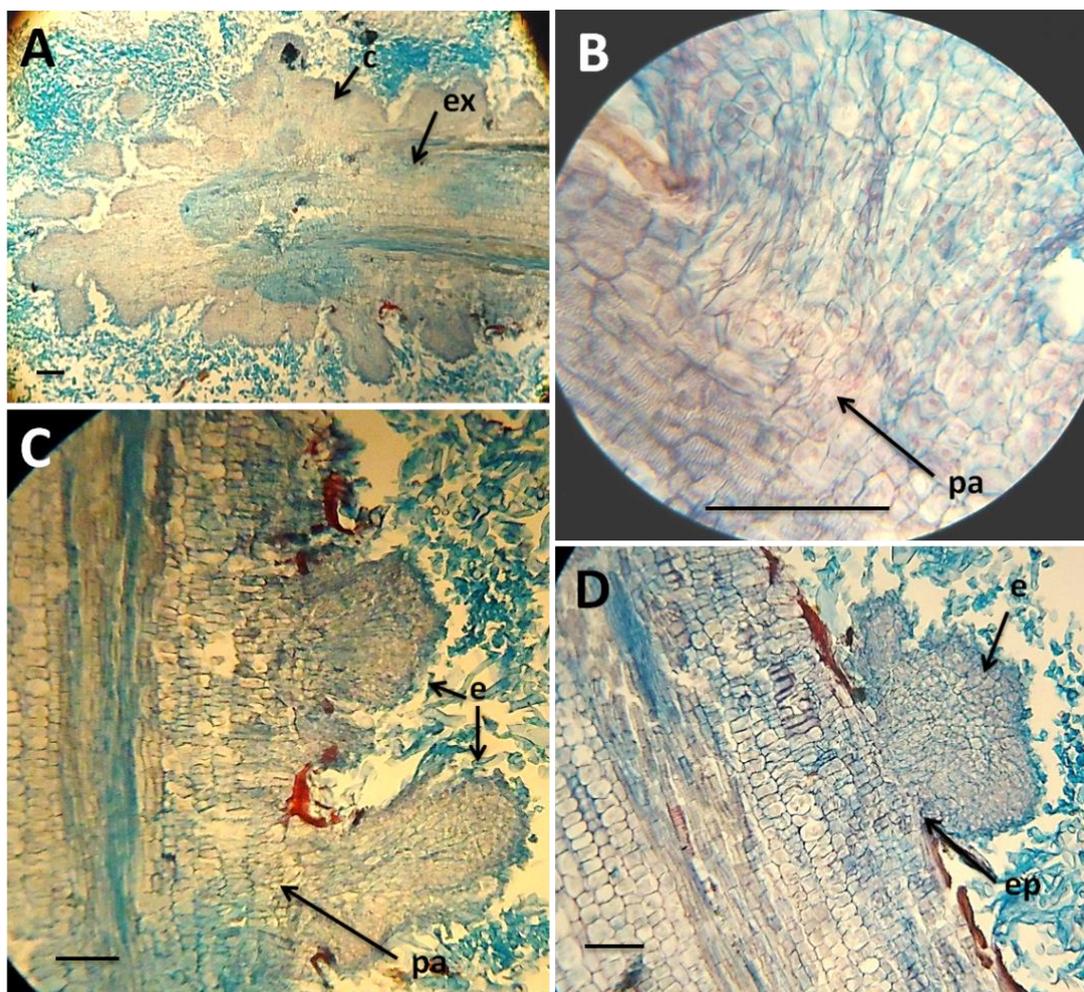


Figura 3 Estudo histológico da embriogênese somática na variedade RB98710. A, B, C e D - Tratamento C1, com iluminação por LED. *c* = calo embriogênico, *ex* = células do explante, *e* = embrião somático, *ep* = células da epiderme, *pa* = células de parênquima. Barra = 100μm

Multiplicação e enraizamento in vitro

A fonte de luz utilizada na sala de crescimento influenciou diretamente a taxa de multiplicação das plantas provenientes da ES. A exposição ao LED mostrou-se mais vantajosa para a variedade estudada, uma vez que a formação de brotos foi superior à encontrada em FL, diferindo significativamente desta a partir do segundo subcultivo (S2) (Figura 4). Também foi possível observar um acréscimo na taxa de multiplicação ao longo dos seis subcultivos realizados (S1 – S6), para os dois tipos de iluminação, chegando até 5,58 brotos para a LED e 4,58 para a FL. Estudos com outras variedades mostram respostas diferentes quanto ao tipo de luz, sendo relatadas maiores taxas de multiplicação na RB872552 quando utilizadas lâmpadas Growlux® (Rocha et al. 2013) e na CTC-07 quando utilizado LED 70% vermelho + 30% azul (Maluta et al. 2013). A menor eficiência de multiplicação e crescimento na

presença de lâmpadas fluorescentes brancas decorre do fato destas emitirem espectro composto por uma ampla gama de comprimentos de onda, entre 350 e 750 nm, que parece ser desnecessária e pouco relevante para a fotomorfogênese e para a fotossíntese (Gupta e Jatothu 2013).

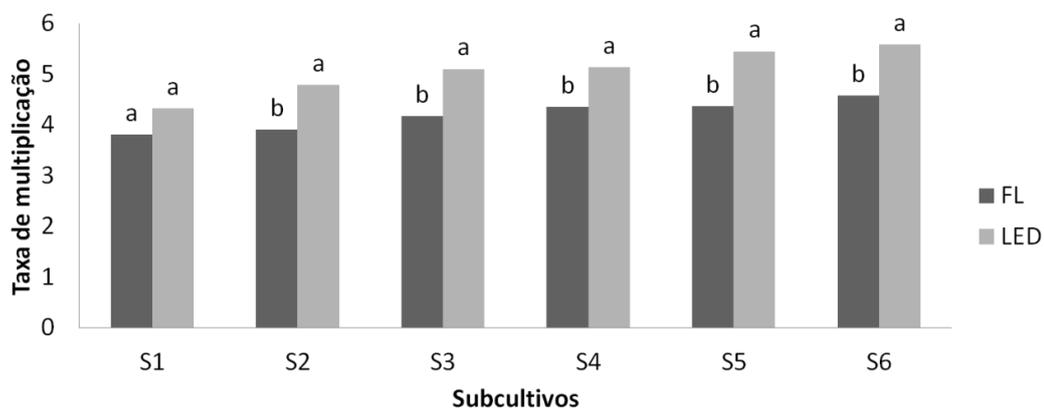


Figura 4 Efeito da iluminação (FL e LED) em concentração de (4,44 μM) de BAP e (6,45 μM) de KIN na multiplicação da variedade RB98710 obtidas por ES. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Ambas as fontes de luz propiciaram o enraizamento das brotações. As lâmpadas LED proporcionaram maior ganho de massa nas raízes e maior número de brotos quando comparada com a FL (Tabela 2), enquanto as variáveis comprimento de raiz, número de folhas e massa fresca e seca da parte aérea não diferiram entre os tratamentos (Tabela 2). O bom desenvolvimento radicular aumenta o potencial da planta de absorver água e nutrientes e, conseqüentemente, aumenta a taxa de sobrevivência após o transplântio (Pasa et al. 2012). Durante o enraizamento *in vitro*, também não foram encontradas diferenças entre a altura das plantas cultivadas sob iluminação LEDs ou FL. Respostas variadas, para esta variável, são relatadas em diferentes trabalhos. Maior altura das plantas foi observada quando utilizado FL (Barros et al. 2011; Maluta et al. 2013), LED verde, vermelho e azul (Rocha et al. 2010), bem como apenas com LED vermelho (Oliveira et al. 2011).

O cultivo de *Anthurium andraeanum* sob lâmpadas LED vermelho + azul e fluorescentes, com intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não apresentou diferença quanto a massa fresca e seca de raiz (Gu et al. 2012), enquanto o presente estudo demonstrou que o uso de LED vermelho + azul (80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi eficiente para esta variável. Isto demonstra que, tanto a qualidade, quanto a

quantidade da luz influenciam diretamente na morfogênese da planta, além da resposta do genótipo a essas variações.

Tabela 2 Efeito da iluminação LED e FL sobre parâmetros de crescimento e densidade estomática (mm²) em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes da embriogênese somática, ao final do enraizamento *in vitro* e aos 15 dias de aclimatização

Variáveis	Enraizamento <i>in vitro</i>		Aclimatização	
	FL	LED	FL	LED
Comprimento da raiz (cm)	2,50 ± 0,31 a	3,20 ± 0,33 a	2,80 ± 0,40 a	3,60 ± 0,85 a
Massa fresca da raiz (g)	0,08 ± 0,013 b	0,16 ± 0,018 a	0,09 ± 0,006 b	0,17 ± 0,016 a
Massa seca da raiz (g)	0,01 ± 0,001 b	0,02 ± 0,001 a	0,01 ± 0,002 b	0,02 ± 0,001 a
Altura da parte aérea (cm)	15,20 ± 1,47 a	17,70 ± 1,19 a	15,70 ± 0,66 b	24,20 ± 1,36 a
Massa fresca da parte aérea (g)	0,16 ± 0,006 a	0,21 ± 0,022 a	0,18 ± 0,009 b	0,22 ± 0,009 a
Massa seca da parte aérea (g)	0,01 ± 0,001 a	0,02 ± 0,003 a	0,01 ± 0,001 b	0,02 ± 0,001 a
Nº de folhas	3,80 ± 0,20 a	4,00 ± 0,01 a	3,80 ± 0,37 b	4,60 ± 0,24 a
Nº de brotos	2,16 ± 0,40 b	3,83 ± 0,21 a	1,66 ± 0,33 b	2,83 ± 0,16 a
Densidade estomática (adaxial)	118 ± 6,66 b	160 ± 4,85 a	118 ± 13,01 a	122 ± 5,65 a
Densidade estomática (abaxial)	158 ± 5,27 b	217 ± 5,27 a	160 ± 12,74 a	205 ± 21,50 a
Sobrevivência (%)	-	-	75	96

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (n=10 ± EP)

Não foi observada diferença entre os teores de clorofila *a* e *b* (Tabela 3). Em *Ananas bracteatus* uma menor irradiância favoreceu o acúmulo de clorofilas (Oliveira et al. 2010), enquanto que em *Gevuina avellana* o aumento da intensidade luminosa para 100 µmol m⁻² s⁻¹ proporcionou o aumento dos teores de clorofila *a* e *b* (Alvarez et al. 2012). Na variedade de cana-de-açúcar CTC-07, menores teores de clorofilas *a* e *b* foram observados em plantas cultivadas sob LED vermelho, provavelmente, em decorrência do desmanche dos tilacóides (Maluta et al. 2013).

Os carotenoides atuam como fotoprotetores (Fátima et al. 2011; Dias et al. 2013) e agem como filtros da luz visível e UV, reduzindo os danos celulares causados pela luz (Barbosa et al. 2014). No presente estudo, as plantas apresentaram maior teor de carotenoides sob o cultivo em lâmpadas LED (Tabela 3). Resultado semelhante foi obtido no cultivo *in vitro* de morango com LED vermelho (Rocha et al. 2010). Já em *Gevuina avellana*, o teor de carotenoides não diferiu quando utilizadas lâmpadas fluorescentes com intensidade luminosa de 100 µmol m⁻² s⁻¹ (Alvarez et al. 2012).

Tabela 3 Efeito da iluminação LED e FL nos conteúdos de pigmentos fotossintéticos em plantas da variedade RB98710, ao final do enraizamento *in vitro* e aos 15 dias de aclimatização

Pigmentos	Enraizamento <i>in vitro</i>		Aclimatização	
	FL	LED	FL	LED
Chl a (mg g ⁻¹ MF)	1,0 ± 0,01 a	1,07 ± 0,05 a	1,26 ± 0,05 a	1,41 ± 0,06a
Chl b (mg g ⁻¹ MF)	0,50 ± 0,02 a	0,53 ± 0,03 a	0,24 ± 0,01 a	0,27 ± 0,01 a
Carotenoides (mg g ⁻¹ MF)	0,16 ± 0,004 b	0,23 ± 0,02 a	0,34 ± 0,01 a	0,36 ± 0,01 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (n=5 ± EP)

Plantas cultivadas *in vitro* têm uma baixa capacidade de controle da perda de água devido ao limitado ou reduzido funcionamento estomático, à má formação da camada de ceras cuticulares e à incompleta formação do mesofilo foliar (Hazarika 2006; Schmildt et al. 2014). O cultivo de plantas sob LED proporcionou uma maior densidade estomática em ambas as faces foliares (Tabela 2), o que foi corroborado por Liu et al. (2014) em *Platycodon grandiflorum*. Portanto, tal resultado pode explicar a maior perda de água, no final da fase de enraizamento *in vitro*, apresentada em plantas cultivadas sob LED (94,95%) em comparação àquelas cultivadas sob lâmpadas FL (66,71%), ao longo de 75 minutos (Figura 5A).

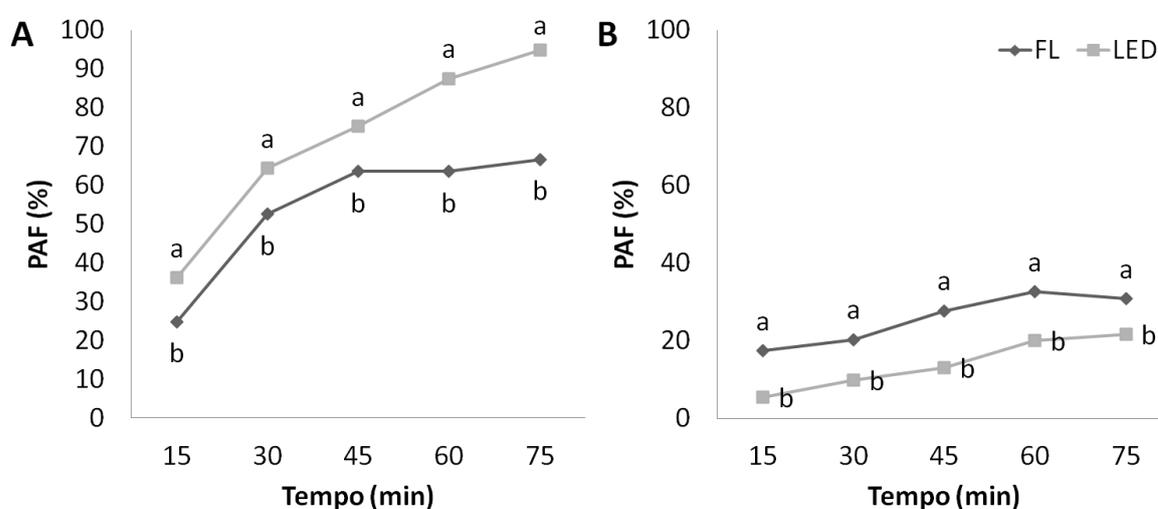


Figura 5 Efeito da iluminação (LED e FL) na perda de água na variedade RB98710 de cana-de-açúcar: (A) ao final do enraizamento *in vitro* e (B) aos 15 dias de aclimatização

Tanto na via de síntese como na de oxidação de moléculas biológicas, ocorre a formação de ROS, que podem produzir sinais oxidativos que regulam a expressão gênica (Foyer e Noctor 2003, Foyer et al. 2012) ou, quando em excesso, causar danos oxidativos. Contudo, quando os mecanismos de defesa antioxidantes são acionados, há uma prevenção no acúmulo dessas ROS (Barbosa et al. 2014). As plantas cultivadas sob iluminação FL apresentaram menor conteúdo de H₂O₂ e menor atividade da APX, enquanto a atividade da SOD e CAT foram superiores (Tabela 4). A peroxidação lipídica, representada pelo conteúdo de MDA, não diferiu entre os tratamentos de luz. Esses resultados demonstram que, de forma geral, as enzimas do sistema antioxidativo das plantas sob as duas fontes de iluminação utilizadas combateram as ROS de forma eficiente.

No cultivo *in vitro* de *Oncidium*, a atividade enzimática foi maior em tratamentos com LED, especialmente de coloração azul, que demonstraram uma maior ativação do sistema de defesa para reduzir o excesso de ROS (Mengxi et al. 2011). Resultado semelhante também foi obtido com a planta medicinal *Rehmannia glutinosa*, em que a modulação da qualidade espectral, com o uso de LED azul ou vermelho, induziu a ativação do sistema de defesa antioxidante e foi diretamente correlacionada com o aumento no conteúdo dos metabólitos de importância farmacêutica (Manivannan et al. 2015).

Tabela 4 Efeito da iluminação LED e FL nos teores de H₂O₂ e MDA e na atividade das enzimas antioxidantes SOD, APX e CAT em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, ao final do enraizamento *in vitro*

	FL	LED
H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ MF)	1,07 ± 0,10 b	2,96 ± 0,17 a
MDA (nmol g ⁻¹ MF)	3,82 ± 0,50 a	3,14 ± 0,11 a
SOD (U mg ⁻¹ prot.)	0,52 ± 0,03 a	0,25 ± 0,02 b
APX (mmol min ⁻¹ mg ⁻¹ MF)	65,0 ± 5,29 b	247,0 ± 16,46 a
CAT (mmol min ⁻¹ mg ⁻¹ MF)	5,33 ± 0,10 a	3,52 ± 0,18 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (n=5 ± EP)

Efeito do uso de LEDs durante o cultivo in vitro na aclimatização de plantas

As plantas provenientes do cultivo com LEDs apresentaram, ao final da aclimatização, incrementos na altura, massa fresca e seca da parte aérea e radicular, além de maior número de folhas e brotos (Tabela 2), demonstrando os efeitos benéficos do uso de LEDs durante o cultivo *in vitro*, favorecem o desenvolvimento das plantas na fase de aclimatização. Apesar da densidade estomática nas plantas aclimatizadas não ter diferido entre os dois tratamentos (Tabela 2), as plantas provenientes do LED apresentaram uma menor perda de água aos 15 dias da aclimatização, com PAF de 21,65% comparado a 30,85% da FL (Figura 5B). Essa maior capacidade de retenção de umidade nas folhas pode ser reflexo de uma maior funcionalidade dos estômatos e, conseqüentemente, um dos fatores responsáveis pela maior taxa de sobrevivência apresentada pelas plantas provenientes do cultivo *in vitro* sob LED (96%) quando comparadas com aquelas da FL (75%) (Tabela 2).

Quanto ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos, não houve diferença entre as plantas provenientes dos diferentes tratamentos de luz (Tabela 3). Em relação ao metabolismo oxidativo, o conteúdo de H_2O_2 se mostrou maior em plantas cultivadas sob LED aos quinze dias de aclimatização, mesmo assim, o conteúdo de MDA não diferiu entre as plantas provenientes de ambas as fontes de luz utilizadas (Figura 6A e B). O declínio no teor de H_2O_2 e MDA ao longo do período de aclimatização evidencia a evolução do ajuste do metabolismo às novas condições ambientais, ou seja, uma nova homeostase. Isso pode ter ocorrido devido a um aumento da atividade das enzimas antioxidantes que atuam na remoção do excesso de ROS e, conseqüentemente, na redução da peroxidação lipídica. Redução análoga no conteúdo de MDA e H_2O_2 também foi observada em *Abrus precatorius* (Peerven et al. 2013).

A atividade da SOD não diferiu entre as plantas provenientes do cultivo sob LED e FL do terceiro dia em diante. No primeiro dia de aclimatização, entretanto, ocorreu uma elevada atividade desta enzima nas plantas provenientes de lâmpadas FL (Figura 6C), sugerindo que estas tenham sofrido mais com a passagem da condição *in vitro* para *ex vitro*. Isto pode ter ocorrido porque as plantas que estavam sendo cultivadas com LEDs estavam sob uma intensidade luminosa maior que a FL, adaptando-se mais facilmente à alta luminosidade encontrada no ambiente *ex vitro*.

APX e CAT são enzimas que eliminam o H_2O_2 (Bhatt e Tripathi 2011). A APX tem alta afinidade com essa ROS, permitindo sua eliminação mesmo em baixas

concentrações (μM) (Locato et al. 2010; Sharma et al. 2012), enquanto a CAT é efetiva em altas concentrações (mM) de H_2O_2 e, por isso, considerada indispensável em condições de estresse severo (Dubey, 2011). No presente estudo, a atividade da APX apresentou-se maior nas plantas provenientes do LED, enquanto a CAT teve maior atividade nas plantas provenientes das lâmpadas FL (Figura 6D e E), sugerindo uma condição de estresse mais ameno para aquelas provenientes do LED.

As enzimas antioxidantes demonstram ser importantes na capacidade das plantas em sobreviver ao estresse oxidativo e desempenham um importante papel na adaptação das plantas transplantadas para condições *ex vitro*. Segundo Batková et al. (2008), plantas que apresentam alto conteúdo de antioxidantes, constitutivos ou induzidos, geralmente são mais adaptadas ao estresse. Assim, a eficiência na manutenção da homeostase redox também pode estar relacionada a uma particularidade da variedade estudada.

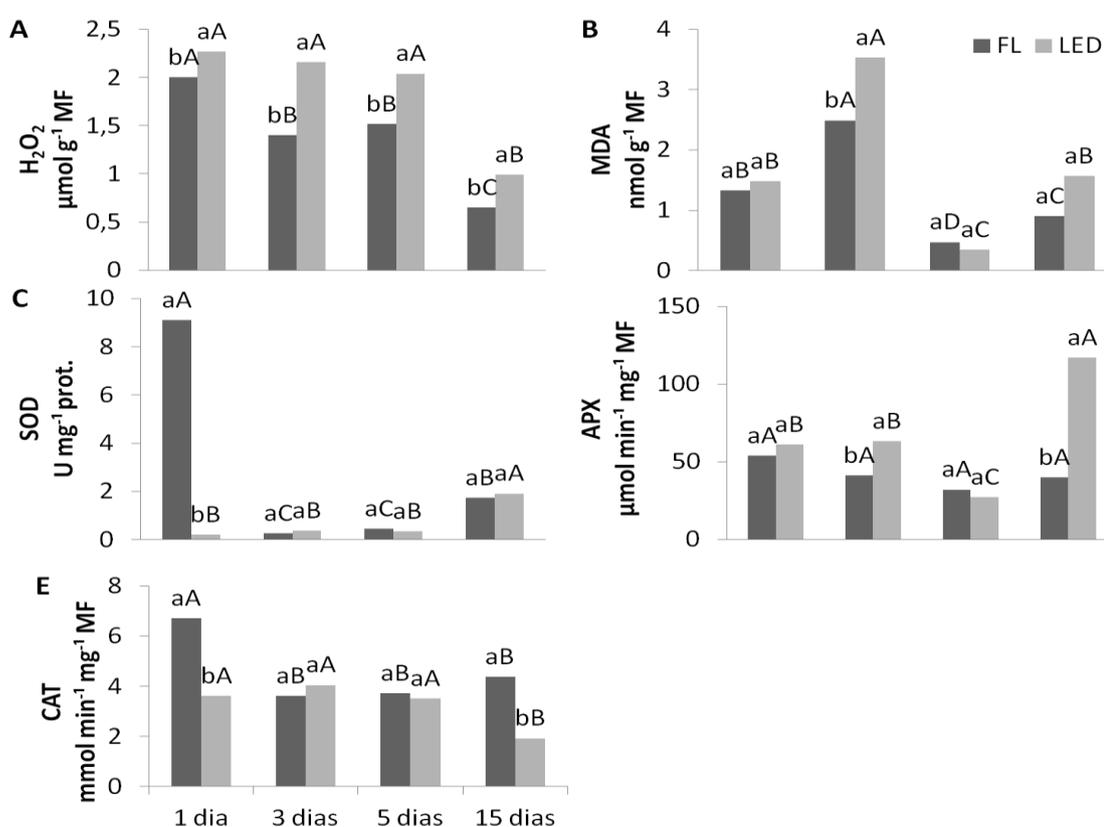


Figura 6 Alterações nos níveis de H_2O_2 (A) e MDA (B) e nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (C), APX (D), CAT (E) em plantas aclimatizadas da variedade RB98710, provenientes do cultivo *in vitro* sob iluminação LED e FL. Médias seguidas de mesma letra minúscula entre iluminação e letra maiúscula entre os dias de coleta não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Conclusão

A obtenção de plantas via embriogênese somática foi mais eficiente quando os explantes foram cultivadas sob luz fluorescente, por outro lado, a qualidade e quantidade de luz emitida pelos LEDs, propiciaram melhores taxas de multiplicação e favoreceram os parâmetros de crescimento das plantas durante o enraizamento *in vitro*. Os tipos de iluminação influenciaram no processo de aclimatização e foram primordiais para o aumento na taxa de sobrevivência das plantas. Em síntese, nas condições do presente experimento, sugere-se que a fase de indução seja realizada sob luz fluorescente e as demais etapas do processo de micropropagação sob luz LED nas condições (82% vermelho:18% azul) e intensidade luminosa de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Agradecimentos

A Capes pela concessão da bolsa de Mestrado e a Biofábrica Governador Miguel Arraes do Centro de Tecnologias Estratégicas para o Nordeste (CETENE), pela concessão das plantas utilizada no experimento.

Referências

Ahmed MR, Anis M (2014) Changes in activity of antioxidant enzymes and photosynthetic machinery during acclimatization of micropropagated *Cassia alata* L. plantlets. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 50:601-609

Alcantara GB, Dibax R, Bepalhok Filho JC, Daros E (2014) Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. Acta Scientiarum 36:63-72

Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karano E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell and Environment 24:1337-1344

Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2005) Effects of light intensities on antioxidant enzymes and malondialdehyde content during short-term acclimatization on micropropagated *Phalaenopsis* plantlet. Env. Exp. Bot. 54:109-120

Alvarez C, Sáez P, Sáez K, Sánchez-Olate M, Ríos D (2012) Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. Plant Cell Tiss Organ Cult 110:93-101

- Arencibia AD, Carmona R, Cornide MT, Menedez E, Molina P (2000) Transgenic sugarcane (*Saccharum* species). In: BAJAJ YPS. (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry 46, Transgenic Crops 1, Heidelberg, Germany: Springer, pp 188-206.
- Arruda P (2011) Perspective of the sugarcane industry in Brazil. *Trop Plant Biol* 4:3-8
- Barbosa MR, Silva MMA, Willadino L, Ulisses C, Camara TR (2014) Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural* 44(3):453-460
- Barros ACB, Costa DA, Medeiros EC (2011) Biorreator de imersão temporária aplicado na biofábrica de cana-de-açúcar. In: Gerald LTS (ed) Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*, São Paulo, Antiqua, pp 52-71
- Basnayake SWV, Moyle R, Birch RG (2011) Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. *Plant Cell Reports* 30(3):439-448
- Batková P, Pospíšilová J, Synková H (2008) Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. *Biol. Plant.* 52:413-422
- Berris LSJ, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133-140
- Bhatt I, Tripathi BN (2011) Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. *Biotechnology Advances* 29:850-859
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Braga FT, Pasqual M, Castro EM, Rafael GC, Favero AC, Valente TCT (2011) Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. *Ciênc agrotec* 35(5):863-868
- Chung JP, Huang CY Dai TE (2010) Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Scientia Horticulturae* 124:511-516
- CONAB (2015) Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar - safra 2015/2016, Brasília 2(1):18
- Dias MC, Pinto G, Correia CM, Moutinho-Pereira J, Silva S, Santos C (2013) Photosynthetic parameters of *Ulmus minor* plantlets affected by irradiance during acclimatization. *Biol Plant* 57:33-40
- Dubey RS (2011) Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: Gupta SD (ed) Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants, Enfield, Science Publishers Chap 9, pp 178-203
- Faisal M, Anis M (2009) Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during *ex vitro*

establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 99:125-132

Fátima N, Ahmad N, Anis M (2011) Enhanced *in vitro* regeneration and change in photosynthetic pigments, biomass and proline content in *Withania somnifera* L. (Dunal) induced by copper and zinc ions. *Plant Physiol Biochem* 49:1465-1471

Feitosa LS, Costa AS, Arrigoni-Blank MF, Dibax R, Botânico MP, Blank AF (2013) Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Biosci J* 29(2):370-377

Ferreira DF (2011) SISVAR: a computer statistical analysis system (Programa). *Lavras: Ciência e Agrotecnologia* 35(6):1039-1042

Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119:355-364

Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany* 63(4):1637-1661

Gu A, Liu W, Ma C, Cui J (2012) Regeneration of *Anthurium andraeanum* from leaf explants and evaluation of microcutting rooting and growth under different light qualities 47(1):88-92

Gupta SD, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnol Rep* 7:211-220

Hazarika BN (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108:105-120

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189-198

Jimenez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47:91-110

Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co., New York, p 523

Joyce P, Kuwahata M, Turner N, Lakshamanan P (2010) Selection system and cocultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. *Plant Cellular Reports* 29(2):173-183

Khan SA, Rashid H, Chaudhary MF, Chaudhry Z, Afroz A (2008) Rapid micropropagation of three elite sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. *African Journal Biotechnology* 7:2147-2180

Khan SJ, Khan MA (2010) Applications of *in vitro* mutation techniques for sugarcane improvement. *Journal of Agricultural Research* 48:429-435

Koch AC, Ramgareeb S, Rutherford RS, Snyman SJ, Watt MP (2012) An *in vitro* mutagenesis protocol for the production of sugarcane tolerant to the herbicide Imazapyr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 48:417-427

Kraus JE, Arduin M (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Rio de Janeiro, p 198

Lichtenthaler H (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148:350-382

Liu M, Xu Z, Guo S, Tang C, Liu X, Jao X (2014) Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandifolium* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. *Sci. Hortic.* 174:112-118

Locato V, Pinto MC, Paradiso A, Gara L (2010) Reactive oxygen species and ascorbate-glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA SD (eds) *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*, Enfield, Science Publishers, pp 45-64

Maluta FA, Bordignon SR, Rossi ML, Ambrosano GMB, Rodrigues PHV (2013) Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. *PAB* 48(9):1303-1307

Manivannan A, Soundararajan P, Halimah N, Ko CH, Jeong BR (2015) Blue LED Light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. *Hort. Environ. Biotechnol.* 56:105-113

Marcano AK, Molina Guevara P, Oropeza M, García E (2002) Optimización del proceso de embriogénesis somática em variedades vénézoelanas de caña de azúcar. *Revista Acta Científica Vénézoelana* 53:1-24

Menezes TSA, Santos TCS, Arrigoni-Blank MF, Blank AF (2012) Embriogênese somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Geintec* 2(1):32-41

Mengxi L, Zhigang X, Yang Y, Yijie F (2011) Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 106:1-10

Mudry CS, Souza DKK, Dibax R, Alcântara GB, Bessalho Filho JC (2013) Embriogênese somática da cultivar RB966928 e do clone RB986419 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Semina: Ciências Agrárias* 34(3):1023-1032

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-49

Nakano Y, Assada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880

Nawaz M, Ullah I, Iqbal N, Iqbal MZ, Javed MA (2013) Improving *in vitro* leaf disk regeneration system of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) with concurrent shoot/root induction from somatic embryos. *Turk J Biol* 37:726-732

Nieves N, Segura-Nieto M, Blanco MA, Sánchez M, González A, González JL, Castillo R (2003) Biochemical characterization of embryogenic and nonembryogenic calluses of sugarcane. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39:343-345

Nhut DT, Huya NP, Taia NT, Nama NB, Luana VQ, Hiena VT, Tunga HT, Vinh BT, Luan TC (2015) Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29(2):299-308

Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Okamoto K, Tanaka M (2003) Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73:43-52

Oliveira RP, Rocha PSG, Scivittano WB (2011) Estruturação de Sistema de LEDs em Laboratório de Cultura de Tecidos. *Circular Técnica, Embrapa* 121:1-6

Oliveira Y, Anselmini JI, Cuquel FL, Pinto F, Quoirin M (2010) Pré-aclimatização *in vitro* de abacaxi-ornamental. *Ciênc. agrotec.* 34:1647-1653

Pasa MS, Carvalho GL, Schuch MW, Schmitz JD, Torchelsen MM, Nickel GK, Sommer LR, Lima TS, Camargo SS (2012) Qualidade de luz e fitoreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. *Ciência Rural* 42(8):1392-1396

Perveen S, Anis M, aref IM (2013) Lipid peroxidation, H₂O₂ content, and antioxidants during acclimatization of *Abrus precatorius* to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 57(3):417-424

Rocha PSG, Oliveira RP, Scivittaro WB (2013) Sugarcane micropropagation using light emitting diodes and adjustment in growth-medium sucrose concentration. *Ciência Rural* 43(7):1168-1173

Rocha PSG, Oliveira RP, Scivittaro WB, Santos UL (2010) Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciência Rural* 40(9):1922-1928

Rodríguez-Sahagún A, Acevedo-Hernández G, Rodríguez-Domínguez JM, Rodríguez-Garay B, Cervantes-Martínez J, Castellanos-Hernández OA (2011) Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104(2):271-275

Schmidt O, Torres Netto A, Schmidt ER, Carvalho VS, Ottoni WC, Campostrini E (2014) Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden' papaya cultivated *in vitro* with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 27:7-18

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012:1-26

Silva MMA, Ulisses C, Medeiros MJL, Granja MMC, Willadino L, Camara T (2014) Antioxidant enzymes activity in embryogenic and non-embryogenic tissues in sugarcane. *Acta biol. Colomb.* 19:203-210

Silveira V, Vita AM, Macedo AF, Dias MFR, Floh EIS, Santa-Catarina C (2013) Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 114:351-364

Snyman SJ, Meyer GM, Koch AC, Banasiak M, Watt MP (2011) Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 47:234-249

Taparia Y, Gallo M, Altpeter F (2012) Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111:131-141

Van der Vyver C (2010) Genetic transformation of the euploid *Saccharum officinarum* via direct and indirect embryogenesis. *Sugar Tech* 12:21-25

Vieira LN, Fraga HPF, Anjos KG, Puttkammer CC, Scherer RF, Silva DA, Guerra MP (2015) Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) 'Nanicão Corupá' *in vitro* plantlets. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 27:91-98

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

A obtenção de plantas via embriogênese somática foi mais eficiente quando os explantes foram cultivadas sob luz fluorescente branca;

A qualidade e quantidade de luz emitida pelos LEDs propiciaram melhores taxas de multiplicação e favoreceram os parâmetros de crescimento das plantas durante o enraizamento *in vitro*;

Os tipos de iluminação influenciaram no processo de aclimatização, e o espectro emitido pelos LEDs durante o cultivo *in vitro* favoreceu o aumento na taxa de sobrevivência das plantas;

Para a variedade RB98710, sugere-se que a fase de indução da embriogênese somática seja realizada sob luz fluorescente e as demais etapas do processo de micropropagação sob luz LED (82% vermelho:18% azul) e intensidade luminosa de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

ANEXOS

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA IN VITRO CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY – PLANT

MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscripts are to be submitted in their final form. Papers must be written in English, and authors are strongly encouraged to aim for clarity, brevity, and accuracy of information and language. Authors whose first language is not English should have their papers checked for linguistic accuracy by a native English speaker. The Editors in Chief may be contacted for recommendations on a scientific editing service, if the English presentation is not to the journal standards but it is the responsibility of the corresponding author to ensure that their submission is to the highest standard. Failure to do so can lead to rejection by the Editors in Chief.

Submitted manuscripts should conform to the following format and sequence. The Reviews format is similar to that for articles described below, except that the body of the text may substitute major topic headings for Materials and Methods, Result, and Discussion. In Reviews, the Methods are integrated into the text or legend to figures and Results and Discussion are combined. Type double-spaced, and order the elements comprising the manuscript as follows:

- Title Page
- Abstract
- Key Words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion (may be combined with Results)
- Conclusions
- Appendix (if any)
- Acknowledgements
- References
- Tables
- Figure Legends
- Figures

TITLE PAGE: The title page should include

- the title of the article
- author(s)' name(s) and affiliation(s) (the department and institution from which the work originated)
- complete contact information for the one corresponding author including mailing and email address. More than one corresponding author will not be accepted.
- suggested running head (not to exceed 40 characters, including spaces) Note that the affiliation should be a footnote to the author's name.

ABSTRACT: An abstract is to be provided, preferably no longer than 250 words. Do not use abbreviations, footnotes, or references in the abstract. NOTE: there is no abbreviation section in submissions. Abbreviations are identified on their first use in the main text of the article.

KEY WORDS: A list of 4–5 key words is to be provided directly below the abstract. Key words should express the precise content of the manuscript, as they are used for indexing purposes.

INTRODUCTION: The introduction provides a brief review of relevant literature and contains embedded justification for the research. The introduction usually ends with a brief and general overview of key results.

MATERIALS AND METHODS: Materials and Methods should provide sufficient detail so that procedures are well understood and can be repeated. Any initial reference to equipment, kits, reagents, lights, etc must be followed by the manufacturer or supplier, city of origin, state (if in the USA) and country of origin.

RESULTS AND DISCUSSION: The Results and Discussion sections may be combined or kept separate.

ACKNOWLEDGMENTS: All acknowledgments, including those for grant, financial support, and potential conflicts of interest should be included in one separate paragraph that directly precedes the references section.

REFERENCES

The list of original references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications should only be mentioned in the text.

In the text, references should be cited by author and year (e.g. Jordan 2000; Jordan and Somers 2006; Jordan et al. 2007) and listed in alphabetical order in the reference list.

JOURNAL ARTICLES:

Name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; Journal title; volume number:page numbers.

Example: Abdel-Rahman MM, Widholm JM (2010) Maize tissue culture plant regeneration ability can be improved by polyethylene glycol treatment. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 46:509–515

SINGLE CONTRIBUTIONS IN A BOOK:

Name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers.

Example: Klein TM (2011) Particle bombardment; An established weapon in the arsenal of plant biotechnologists. In: Stewart CN, Touraev A, Citovsky V, Tzfira T (eds) *Plant transformation technologies*, Wiley-Blackwell, Ames West Sussex Oxford, pp 53–71

BOOK:

Name and initial(s) of all authors; year; title; publisher; place of publication.

Example: Wang K (2006) *Methods in Molecular Biology: Agrobacterium Protocols*, vol 1. Humana Press, Totowa New Jersey

AGENCY PUBLICATION:

Council of science editors (CSE) style guide. 7th ed. Reston, VA: Council of Science Editors; 2006.

WEB PAGES:

Article by DOI (with page numbers): Nguyen KT, Arsenault PR, Weathers PJ (2011) Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. In Vitro Cell Dev Biol – Plant 47:329-338. doi: 10.1007/s11627-011-9343-x

Article by DOI (before issue publication with page numbers): Nguyen KT, Arsenault PR, Weathers PJ (2011) Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. In Vitro Cell Dev Biol – Plant (in press). doi: 10.1007/s11627-011-9343-x

Article in electronic journal by DOI (no paginated version): Nguyen KT, Arsenault PR, Weathers PJ (2011) Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. In Vitro Cell Dev Biol – Plant. doi: 10.1007/s11627-011-9343-x

Online document: Doe J (2010) Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 2010

Online database: Healthwise Knowledgebase (2011) US Pharmacopeia, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 July 2011

Supplementary material/private homepage: Doe J (2010) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2010 University site: Doe J (2008) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 2008

FTP site Doe J (2010) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 2010

Organization site: ISSN International Centre (2006) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2007

NOMENCLATURE

The recommendations of the Society for In Vitro Biology Committee on Terminology should be followed. Schaeffer WI (1990) Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. In Vitro Cell Dev Biol 26:97–101.

TABLES AND FIGURES

TABLES: Each table should be numbered consecutively with Arabic numerals. Footnotes to tables should be indicated by lower-case superscript letters. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge fully.

LEGENDS: Legends must be brief, self-sufficient explanations of the figures and tables in no more than four or five lines. Remarks such as “For explanation, see text” should be avoided. The figure legends should be typed double-spaced and grouped together on a separate page. When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the illustration, identify and explain each one clearly.

FIGURES: Figures should be limited to those essential for the text. Results should not be duplicated by presentation of the same results in both a graph and table. Color may be

used without charge for the electronic edition of the journal if files are supplied but will appear in the printed version in black and white. NOTE: If the authors wish to have their figures printed in color, the authors will be questioned about color options after the paper enters production and the pictures will be published in color at the author's expense: \$534 per article (+VAT). At such time an e-mail will be sent to authors asking them to select an option for color printing of figures. Except for the cost of color printing there are no publication charges for publishing in IVP, unless the author chooses to publish his/her paper Open Access (Open Choice). More information on Open Choice can be found on the journal homepage (<http://www.springer.com/life+sciences/plant+sciences/journal/11627>).

ALL FIGURES, whether photographs, graphs, or diagrams, should be numbered consecutively. If figures are created electronically, please see Guidelines for Electronically Produced Figures for Print. Line drawings should be supplied as clear black and white drawings suitable for reproduction. All lines should be of uniform thickness. Letters and numbers should be of professional quality and proper dimensions. All figures submitted should allow for high quality reproduction at a same size permitting direct printing (with no reduction), usually 12.7 by 17.3 cm (5 by 7 inches) but no larger than 20.3 by 25.4 cm (8 by 10 inches). The publisher reserves the right to reduce figures. Micrographs should have an internal magnification marker; the marker size should be stated in the figure legend. If photographs of persons are used, either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph.

Guidelines for Electronically Produced Illustrations for Print

GENERAL

- Send figures separately from the text (i.e. files should not be integrated with text files).

VECTOR (line) GRAPHICS

- Vector graphics exported from a drawing program should be stored in EPS format. High quality Excel files are also acceptable.
- Suitable drawing program: Adobe Illustrator. For simple line art the following drawing programs are also acceptable: PowerPoint, Corel Draw, Freehand, Canvas.
- No rules narrower than 0.25 pt.
- No gray screens paler than 15% or darker than 60%.
- Screens meant to be differentiated from one another must differ by at least 15%.

HALFTONE FIGURES

- Black & white and color figures should be saved in JPG, TIFF or EPS formats.
- Figures should be created using Adobe Photoshop whenever possible.

GRAPHICS FROM VIDEOS

- Separate files should be prepared for the frames from a video that are to be printed in the journal. When preparing these files you should follow the same rules as listed under Halftone Figures.

MULTIMEDIA ARTICLE AND DYNAMIC MANUSCRIPT SUBMISSION REQUIREMENTS (I.E. STREAMING VIDEOS)

Multimedia articles are papers where the heart of the article is the video and, generally, only an abstract and references are included. Dynamic articles are regular articles with video(s) included as electronic supplementary material.

Upon submission of multimedia or dynamic articles, the author(s) will be required to submit the video in the following format:

- For multimedia articles, video clips should not exceed 9 minutes. For dynamic articles, video clips should not exceed 3 minutes and each manuscript should not contain more than 3 video clips.
- Multimedia file for review and submission: MPEG-1 file with the largest frame size (usually 320 x 240 pixels) that will fit on a CD and will be playable on a Windows-based computer.
- The content of these files must be identical to that reviewed and accepted by the editors of the *In Vitro Plant and Animal Journals*.
- All narration should be in English.
- There should be a “manuscript” submitted with the video that includes a title page, abstract and key words, as well as references if needed.

DYNAMIC MANUSCRIPT

A dynamic manuscript is a print article with imbedded video material. Up to 3 (one minute maximum each) videos per manuscript submission will be accepted. Make sure to note in your manuscript the placement of the video clips. All standard instructions for manuscript and video submission should be followed for a dynamic manuscript submission.

SPRINGER OPEN CHOICE

In addition to the traditional publication process, Springer provides Springer Open Choice, which is Springer’s open access model. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular article, but in addition is made freely available through Springer’s online platform SpringerLink. If you wish to publish via Springer Open Choice, you will have the opportunity to make this request after your paper enters production. At such time an e-mail will be sent to authors asking them to select an option for Springer Open Choice.

COPYRIGHT

To maintain and protect the Society’s ownership and rights and to protect the original authors from misappropriations of their work, SIVB requires the corresponding author to sign a copyright transfer agreement on behalf of all of the authors. Unless this agreement is executed (without changes or addenda) and received by the Editorial Office, SIVB will not publish the manuscript either online or in print. For online submissions, this form will be sent to you electronically upon submission of your manuscript. Once signed, it can either be faxed, e-mailed as a pdf or directly mailed to: Michele Schultz, Publications Manager, Society for In Vitro Biology, 514 Daniels St., Suite 411, Raleigh, NC 27605, USA, (Fax: 919-562-0608) (e-mail: sivb@sivb.org).

If ALL authors were employed by the US government when the work was performed, the corresponding author should not sign the copyright transfer agreement, but should instead attach to the agreement a statement attesting that the manuscript was prepared as part of their official duties and, as such, is a work of the US government not subject to copyright.

If SOME of the authors were employed by the US government when the work was performed but others were not, the corresponding author should sign the copyright transfer agreement as it applies to that portion performed by the non-governmental employee authors.

Upon submitting an article to In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant for review and possible publication, authors are requested to add the following notice for the first screen of any posted electronic preprint versions of the paper. “This work has been submitted to the Society for In Vitro Biology for possible publication in In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. Copyright may be transferred without notice, after which this version may no longer be accessible.”

When the work has been accepted for publication, the author may post it, in its final accepted form, on their personal server or on their institution’s server (but not on any organized preprint server) with a notice: “Accepted for publication in In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant as of (date), until it is published by the Society in print or electronic form.”

After publication, authors may post their Society copyrighted material on their own server or on their institutions server without permission, provided that it includes the following notice: “This material has been published in (name of journal, issue number and date, page numbers), the only accredited archive of the content that has been certified and accepted after peer review. Copyright and all rights therein are retained by the Society for In Vitro Biology. This material may not be copied or e-posted without explicit permission of the copyright owner.” Please provide a link to the reproduction page of the SIVB website with the following text: “For more information about Reproduction Permission for this article, please visit the SIVB website at www.sivb.org/pubs_reproductionPermission.asp”