

GEMIMA MANÇO DE MELO

**INSTABILIDADE FENOTÍPICA NA VARIEDADE RB872552 DE CANA-DE-
AÇÚCAR: MARCADORES ISSR E ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO**

RECIFE

2011

GEMIMA MANÇO DE MELO

**INSTABILIDADE FENOTÍPICA NA VARIEDADE RB872552 DE CANA-DE-
AÇÚCAR: MARCADORES ISSR E ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Agronomia, área de concentração: Melhoramento Genético de Plantas.

Orientadora: Profa. Dra. Lilia Willadino

Coorientadores: Profa. Dra. Cláudia Ulisses

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

RECIFE

2011

Ficha catalográfica

M528i Melo, Gemima Manço de
Instabilidade fenotípica na variedade RB872552 de cana-
de-açúcar: marcadores ISSR e enzimas do sistema
antioxidativo / Gemima Manço de Melo. – 2011.
81 f. : il.

Orientadora: Lilia Willadino.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Melhoramento
Genético de Plantas) – Departamento de Agronomia,
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

Inclui referências e anexo.

1. *Saccharum* spp. 2. Biorreator de imersão
temporária 3. Massa verde 4. Micropropagação 5. Variação
morfofisiológica, 6. 6-benzilaminopurina I. Willadino, Lilia,
orientadora II. Título

CDD 581.15

GEMIMA MANÇO DE MELO

**INSTABILIDADE FENOTÍPICA NA VARIEDADE RB872552 DE
CANA-DE-AÇÚCAR: MARCADORES ISSR E ENZIMAS DO SISTEMA
ANTIOXIDATIVO**

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 16/02/2011.

Orientadora: _____

Dra. Lilia Willadino

Professora do Departamento de Biologia - UFRPE

Examinadores:

Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal (Membro Titular)

Professora do Departamento de Genética - UFPE

Dra. Andréa Cristina Baltar Barros (Membro Titular)

Coordenadora da Biofábrica Governador Miguel Arraes - CETENE

Dra. Josabete Salgueiro Bezerra de Carvalho (Membro Titular)

Professora da Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Recife

16 de fevereiro de 2011

A cada barreira rompida...
A cada gota de suor caída...
A todos os lugares que andei...
A tudo que passei...
A tudo que aprendi e descobri...
E aos amigos que conquistei...

Ofereço

*À raiz de minha existência, à minha
fonte de força e coragem para vencer
os obstáculos impostos pela vida -
Raquel, Glécio e Manuelita.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A ti Senhor, por iluminar e me ajudar a trilhar todos os caminhos traçados por ti e por jamais ter me desamparado em meio à tempestade.

A minha amada família, por todo amor, carinho, confiança, paciência, compreensão e por ter me ajudado a seguir com fé e esperança.

A minha orientadora Lília Willadino, por tudo que fez e vem fazendo na minha vida acadêmica, por todos os conselhos, incentivos, palavras de conforto e tranquilidade que nos transmite. Por estar aqui hoje prestes a defender este trabalho.

A minha coorientadora Cláudia Ulisses, por nos momentos mais difíceis sempre me ajudar com seus conselhos e com sua amizade. Por toda fé e determinação que brota de ti e nos motiva a conquistar novos caminhos.

Ao meu coorientador Reginaldo pelo apoio, ensinamentos e pelas colaborações valiosas para a conclusão deste trabalho.

Ao meu amado Filipe, por todos os anos de amizade, que se transformaram em carinho, afeto e no mais sublime sentimento que nos uni. Por toda compreensão, incentivo e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

A minha amiga Gilvany, pela grandiosa ajuda dada para o desenvolvimento deste trabalho, por tudo que passamos e com quem espero ainda passar na Universidade.

A Wellington, pela sua amizade, pelos ensinamentos, pela ajuda com as enzimas, enfim por você ser essa pessoa que contagia o LCTV.

A professora Terezinha, por todos os conselhos, apoio e ensinamentos, que contribuíram para o meu desenvolvimento.

Aos meus amigos Vitor, Patrícia e Marta, com os quais sempre posso contar em todos os momentos de minha vida.

As minhas amigas Amanda e Lela, por toda ajuda durante o curso, por terem me acolhido em sua casa durante as provas e trabalhos, sempre me fazendo aquele cafezinho, para me manter acordada diante de tanto cansaço. Por todos os momentos que passamos, sou grata a vocês.

A Marciana, Lais, Luciana, Silvany, Karine, Jayne, Natália, João, Ronaldo, Fernando, Arquimedes, amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, por todo apoio e momentos de apreensão ou de divertimento - salve salve “Felino no Brasa”.

A Kaliny, Iêda, Jonathas, Alex, Jean, Maiara, Luiza, Leo, Sérgio e aos professores Martin, Paulo e Maria de Mascena por todo o apoio e por terem me recebido no Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA da UFRPE.

A Biofábrica Governador Miguel Arraes pelo fornecimento dos biorreatores de imersão temporária.

A Lúcio, Gilson, Emanuel, Thaiza, Robson, Claudinha, Andréa, Helder, Cláudia, André, Odemar, enfim todos que me receberam e ajudaram na Biofábrica.

Aos professores Gerson Quirino, Vivian Loges, Clodoaldo e todos que contribuíram para a minha formação e a turma do mestrado que trabalhou unida para o crescimento do nosso curso.

A Bernadete e ao senhor Narciso, por toda ajuda durante esses dois anos.

Aos membros da Banca Examinadora por toda a contribuição dada a este trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu desenvolvimento durante o Mestrado e também por fazerem parte de minha vida.

Muito obrigada!

*“Mesmo as noites totalmente sem
estrelas podem anunciar a aurora de
uma grande realização”*

Martin Luther King

RESUMO

A cultura da cana-de-açúcar destaca-se por apresentar grande importância no desenvolvimento sócio-econômico do Brasil, sendo uma das primeiras atividades econômicas da história do país. A multiplicação comercial de variedades de cana-de-açúcar tem sido realizada com sucesso mediante a aplicação de técnicas de cultura de tecidos, como exemplo o sistema de biorreator de imersão temporária (BIT). Nesse sistema o material vegetal fica imerso em meio líquido por intervalos controlados de tempo, o qual favorece a absorção dos nutrientes do meio de cultura estimulando a produção das mudas. Da introdução *in vitro* até a aclimatização, o material vegetal é submetido a condições ambientais incomuns que podem provocar desajustes fisiológicos, morfológicos, bioquímicos ou moleculares. Tais desajustes podem gerar grandes perdas na produção de biofábricas, como também em instituições de pesquisa. Sendo assim, a avaliação tanto a nível bioquímico quanto molecular de plantas cultivadas *in vitro* apresenta grande importância para produção de mudas geneticamente fiéis a planta matriz. Com o objetivo de avaliar a causa da desordem fisiológica observada na variedade RB872552 de cana-de-açúcar que provocou o crescimento desordenado de pequenas brotações, formando um aglomerado de brotos conhecido como “massa verde”, foram realizadas análises bioquímica e molecular. As “massas verdes” e as plantas coletadas dos BITs foram subcultivadas em frascos contendo meio MS líquido suplementado ou não com 1,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), seguindo o sistema convencional de micropropagação de cana-de-açúcar. A atividade da catalase e da peroxidase foi mais elevada nas amostras de “massa verde” cultivadas em BIT. A atividade da peroxidase do ascorbato foi maior nas “massas verdes” cultivadas na presença de BAP nos dois sistemas de micropropagação. Os fragmentos de DNA obtidos após a amplificação de todo o material vegetal analisado apresentou monomorfismo, sugerindo fidelidade genética do material clonado. O perfil enzimático do sistema antioxidativo associado à análise molecular evidenciam que a desordem fisiológica que resultou no surgimento das “massas verdes”, não foi provocada por variação genética e sim resultado das condições de estresse ao qual o material foi submetido durante o cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., biorreator de imersão temporária, massa verde, micropropagação, variação morfofisiológica, 6-benzilaminopurina.

ABSTRACT

The sugarcane culture has great importance in the socio-economic development of Brazil, being one of the earliest economic activities in the country's history. The proliferation of commercial varieties of sugarcane has been successfully accomplished by applying techniques of tissue culture, as an example the system of temporary immersion bioreactor (TIB). In this system the plant material is immersed in liquid medium for controlled intervals of time, which favors the absorption of nutrients from the culture medium by stimulating the production of seedlings. During the *in vitro* culture the plant material is submitted to unusual environmental conditions that can cause physiological morphological, biochemical and molecular imbalances. Such imbalances can lead to large losses in the production of biofactories, as well as in research institutions. Therefore, the evaluation both biochemical and molecular *in vitro* plants has great importance for the production of seedlings genetically faithful to matrix plant. In order to assess the causes of physiological disorder observed in sugarcane RB872552 variety which caused the uncontrolled growth of small buds, forming a cluster of shoots known a "green mass" were performed biochemical and molecular analysis. The "masses" green "and the plants were collected by the TIB and subcultured in flasks containing MS liquid medium supplemented or not with 1.5 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP), following the conventional micropropagation of sugarcane. The activity of catalase and peroxidase was higher in samples of "green mass" cultured on TIB. The ascorbate peroxidase activity was higher in the "green masses cultured in the presence of BAP in the two micropropagation systems. The ascorbate peroxidase activity was higher in the "green masses" grow in the presence of BAP in the two micropropagation systems. The DNA fragments obtained after amplification of the whole plant material analyzed showed monomorphism, suggesting genetic fidelity of cloned material. The profile of enzymatic antioxidative system associated with the molecular analysis showed that the physiological disorder that resulted in the emergence of "green masses" was not caused by genetic variation but a result of stress conditions to which the material was submitted during cultivation *in vitro*.

Keywords: *Saccharum* spp., temporary immersion bioreactor, green mass, micropropagation, morphophysiological variation, 6-benzylaminopurine.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Morfologia do desenvolvimento da cana-de-açúcar	17
Figura 2. Produção de cana-de-açúcar da safra 2010/2011: (A) percentual da produção nordestina; (B) percentual da produção nacional	20
Figura 3. Sistema tradicional de micropropagação	22
Figura 4. Sistema de biorreator de imersão temporária (BIT)	24
Figura 5. Formação de espécies reativas de oxigênio: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet})	28

CAPÍTULO II - INSTABILIDADE FENOTÍPICA NA VARIEDADE RB872552 DE CANA-DE-AÇÚCAR: MARCADORES ISSR E ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO

Figura 1. Material vegetal da variedade RB872552 de cana-de-açúcar proveniente do cultivo em sistema de biorreator de imersão temporária após sucessivos subcultivos em meio MS suplementado com $1,5\text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP): (a) plantas; (b) “massas verdes”	55
Figura 2. Atividade enzimática na variedade RB872552 de cana-de-açúcar: (a) atividade da catalase; (b) atividade da peroxidase	61
Figura 3. Atividade enzimática da peroxidase do ascorbato na variedade RB872552 de cana-de-açúcar	62
Figura 4. Monomorfismo dos fragmentos amplificados com o <i>primer</i> UBC 844	63
Figura 5. Material vegetal da variedade RB872552 de cana-de-açúcar: (a) “massas verdes” proveniente do cultivo em sistema de biorreator de imersão temporária após seis subcultivos em meio MS suplementado com $1,5\text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP); (b) plantas provenientes da reversão das “massas verdes” subcultivadas em meio MS líquido sem agitação e sem a adição do 6-benzilaminopurina (BAP)	65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - INSTABILIDADE FENOTÍPICA NA VARIEDADE RB872552 DE CANA-DE-AÇÚCAR: MARCADORES ISSR E ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados no material vegetal da variedade RB872552 de cana-de-açúcar	56
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores ISSR utilizados na amplificação do DNA da variedade RB872552 de cana-de-açúcar, incluindo suas temperaturas de anelamento (T _m) e o número total de bandas	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
AIB – ácido indolbutírico
ANA – Ácido naftalenoacético
APX – Peroxidase do ascorbato
BIT – Biorreator de imersão temporária
CAT – Catalase
CIN – Cinetina
CO₂ – Dióxido de carbono
CuSOD – Enzima superóxido dismutase contendo cobre
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Dinucleotídeo trifosfato
ESD – Embriogênese somática direta
Fe²⁺ – Ferro
FeSOD – Enzima superóxido dismutase contendo ferro
GR – Glutathione redutase
GSH – Glutathione reduzida
GSSG – Glutathione oxidada
HO₂[•] – Radical hidropéroxido
H₂O₂ – Péroxido de hidrogênio
ISSR – Sequência simples repetida interna
MEG – Monoetileno glicol
MnSOD – Enzima superóxido dismutase contendo manganês
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
¹O₂ – Oxigênio singleto
O₂ – Oxigênio molecular
O₂^{•-} – Radical superóxido
OH[•] – Radical hidroxila
Olii – Oligonucleotídeo iniciador
PBA – (6-benzilamino)-9-2-tetrahidropiranyl-9H-purina
Pb – Pares de bases
PCR – Reação em cadeia da polimerase
POD – Peroxidase
PPO – Polifenoloxidase

PTA – Ácido politereftálico
RAPD – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
RFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RuBP – Ribulose 1,5-bifosfato
SOD – Superóxido dismutase
SSR – Repetições de sequências simples
Taq – *Thermus aquaticus*
TDZ – Tiazuron
T_m – Temperatura de anelamento
ZEA – Zeatina
ZnSOD – Enzima superóxido dismutase contendo zinco
2iP – Isopenteniladenina
2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A cultura da cana-de-açúcar	17
2.2 Importância econômica	19
2.3 Micropropagação	21
2.3.1 Sistema tradicional de micropropagação	22
2.3.2 Sistema de biorreator de imersão temporária (BIT)	23
2.4 Reguladores de crescimento	25
2.5 Estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio	27
2.6 Sistema antioxidativo	29
2.7 Variação somaclonal	31
2.8 Uso de marcadores moleculares	32
3 REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO II	48
Instabilidade fenotípica na variedade RB872552 de cana-de-açúcar: marcadores ISSR e enzimas do sistema antioxidativo	49
Resumo	50
Abstract	51
Introdução	52
Material e métodos	55
<i>Material Vegetal e condições de cultivo</i>	55
<i>Análises bioquímicas</i>	56
<i>Análise molecular</i>	58
Resultados e discussão	59
<i>Análises bioquímicas</i>	59
<i>Análise molecular</i>	63
Conclusão	68
Referências	69
ANEXO	76
INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY.....	77

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Saccharum* L. possui ampla adaptação a condições tropicais e subtropicais com alta disponibilidade de água e radiação solar, o que permite o armazenamento de grande quantidade de sacarose nos tecidos dos colmos. É uma cultura agrícola de extrema importância comercial (TEJERA et al., 2007), sendo considerado um dos quatro gêneros da família Poaceae que apresenta maior produção global (JUDD et al., 2009).

O cultivo da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) gera milhares de empregos diretos e indiretos nas variadas atividades do setor sucroalcooleiro. Entre as oportunidades de negócio deste setor, destacam-se: a produção da cana-de-açúcar para o processamento de açúcar, álcool e produtos derivados de subprodutos, bem como serviços de pesquisa, capacitação, assistência técnica e creditícia, transporte, comercialização, exportação e serviços portuários.

No Brasil, o setor sucroalcooleiro é o mais competitivo do mundo, apresentando os maiores níveis de produtividade, rendimento e menores custos na produção, além de condições edafoclimáticas que propiciam o desenvolvimento da cultura, sendo considerado referência para os demais países produtores (VIDAL, 2010).

Por ser uma cultura economicamente rentável, a sua inserção em pesquisas que visam o aumento na produção de mudas é uma realidade. Técnicas de cultivo *in vitro*, como a micropropagação em sistema tradicional e em sistema de biorreatores de imersão temporária (BIT) podem aumentar a produção de mudas com alto padrão em quantidade suficiente para suprir a demanda do mercado.

O sistema de imersão temporária, desenvolvido por Teisson e Alvard (1994), vem sendo utilizado com sucesso na micropropagação por diversos autores (DAQUINTA et al., 1997; PONCE, 1997; FEUSER et al., 2003; YOUNG et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006). Esse método consiste na imersão do material vegetal em meio líquido, a intervalos regulares, seguido de drenagem. O explante entra totalmente em contato com o meio, tornando o seu desenvolvimento e crescimento mais efetivos, uma vez que, na propagação *in vitro*, a oxigenação e o contato entre meio de cultura e explante são fatores fundamentais para a capacidade micropropagativa (LEMOS, 1996).

Os indivíduos produzidos mediante as técnicas de cultivo *in vitro* são geneticamente idênticos ao material de origem, porém variações somaclonais

podem surgir devido a condições químicas e físicas do cultivo e a fatores referentes ao número e à duração dos subcultivos (CHANNARAYAPPA, 2007).

Durante o processo de micropropagação, as plantas ou explantes são submetidos a condições ambientais incomuns, quando comparadas aos cultivos em casa de vegetação ou no campo (GASPAR et al., 2002). O estresse do ambiente *in vitro* apresenta-se na forma de estresse oxidativo, causado por um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes e compostos pré-oxidantes que leva ao aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CASSELLS e CURY, 2001). Portanto, é imprescindível que, em qualquer sistema de micropropagação, seja realizado um acompanhamento das variações fisiológicas e genéticas do material clonado. Estas podem ser realizadas, respectivamente, através de enzimas do sistema antioxidativo e por meio de marcadores moleculares, como o ISSR (sequência simples repetida interna), por exemplo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o nível de estresse oxidativo mediante enzimas do sistema antioxidativo e a fidelidade genética do material vegetal da variedade RB872552 de cana-de-açúcar, proveniente de micropropagação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, pertencente à classe Liliopsida (Monocotyledoneae), ordem Poales, família Poaceae (gramíneas), tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum* (BORÉM, SILVA e DIOLA, 2010).

Considerada essencialmente uma planta tropical, a cana-de-açúcar apresenta ciclo semiperene, hábito herbáceo e o seu cultivo ocorre entre as latitudes 35° N e 30° S, em altitudes que variam do nível do mar até 1.000 m ou um pouco mais (DIOLA e SANTOS, 2010). É uma planta que se desenvolve em forma de touceira, tendo a parte aérea formada por colmos, folhas e inflorescências e a subterrânea formada por rizomas e raízes (Figura 1).

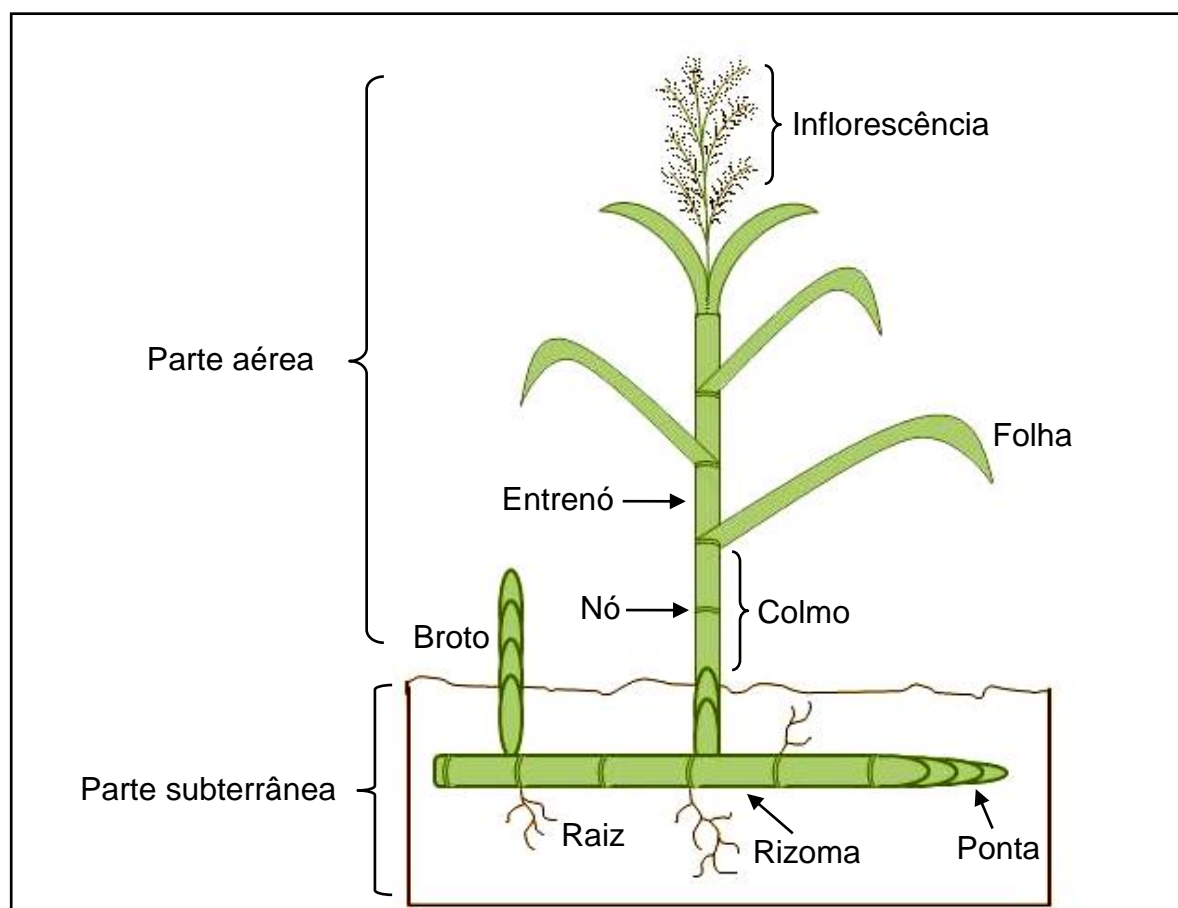


Figura 1. Morfologia do desenvolvimento da cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar apresenta via fotossintética C_4 , a qual proporciona maior eficiência na fixação do CO_2 e conseqüentemente maior produção de carboidratos. Nesse mecanismo, a alta concentração de CO_2 e a baixa concentração de O_2

limitam a fotorrespiração e favorece, durante o ciclo de Calvin, a carboxilação da ribulose 1,5-bifosfato (RuBP). Durante esse ciclo, a incorporação dos três átomos de carbono provenientes das três moléculas de CO₂ produz uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato, forma fosforilada do C₃H₆O₃. Essa mesma molécula é exportada para o citossol, onde por meio de uma série de reações é convertida em carboidratos (TAIZ e ZEIGER, 2004; RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2007).

Nativa das regiões tropicais, a cana-de-açúcar possui seu centro de origem no sudeste asiático, entre as regiões da Indonésia e da Nova Guiné (MATSUOKA, GARCIA e ARIZONO, 2005). Durante a Pré-história, os homens domesticaram as plantas, selecionando-as mediante padrões de crescimento, desenvolvimento e utilização como alimento. A domesticação da cana-de-açúcar ocorreu aproximadamente a 2.500 a.C., pelos nativos da região da Indonésia e Nova Guiné, que utilizavam a espécie tanto para construção de cercados quanto para apreciar o seu caldo açucarado. A sua dispersão ocorreu por meio das migrações daqueles povos para as ilhas do Pacífico Sul, Índia, China e adjacências entre 1.500 e 1.000 a.C. (LEBOT, 1999; MATSUOKA, GARCIA e ARIZONO, 2005). Os árabes levaram-na para o Norte da África e Sul da Europa, os portugueses e os espanhóis levaram a cultura para implantação nas suas colônias, fazendo com que Portugal fosse, por um bom tempo do período colonial, o maior produtor mundial de açúcar (CUENCA e NAZÁRIO, 2005).

A primeira muda de cana-de-açúcar foi trazida para o Brasil em 1532, por Martim Afonso de Souza, como o sustentáculo econômico das capitanias hereditárias (MACHADO, 2003; MINISTÉRIO da CIÊNCIA e TECNOLOGIA, 2004). A planta se adaptou rapidamente, graças ao solo fértil, às condições climáticas favoráveis e à mão-de-obra escrava trazida da África. No Brasil, o primeiro engenho foi fundado por volta de 1532, na Capitania de São Vicente- SP. Em seguida, nas Capitanias de Pernambuco e da Bahia, os engenhos de açúcar se multiplicaram, dando início a uma indústria com rápida expansão e perpetuação (MACHADO, 2003; CUENCA e NAZÁRIO, 2005).

As atuais variedades de cana-de-açúcar plantadas no Brasil são altamente poliploides, sendo as cultivares modernas derivadas de uma hibridação interespecífica entre a espécie domesticada *S. officinarum* “cana nobre” e a espécie silvestre *S. spontaneum* (D’HONT, 2005). Devido a essa hibridação, o resultado do alto teor de açúcar é atribuído à “cana nobre”, enquanto que o vigor vegetativo, a resistência a pragas e doenças, a rusticidade e adaptação a diferentes condições

edafo-climáticas são características provenientes de *S. spontaneum* (PICELLI, 2010).

2.2 Importância econômica

O cultivo da cana-de-açúcar é uma das primeiras atividades econômicas documentadas na história do Brasil e desde o século XVI é o setor mais importante da economia colonial (CUENCA e NAZÁRIO, 2005), possuindo importância histórica, política, social e econômica. Sua importância pode ser atribuída à sua ampla utilização, podendo ser empregada *in natura*, como planta forrageira; disponibilizar subprodutos e resíduos como a levedura, a torta de filtro e o bagaço; ou como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool (SOUZA e SANTOS, 2002; CUENCA e MANDARINO, 2007).

O Brasil domina todos os estádios da tecnologia de produção de cana-de-açúcar, álcool e açúcar, bem como é referência mundial como produtor de energia renovável e limpa. O setor sucroalcooleiro é o mais competitivo do mundo, visto que possui maiores níveis de produtividade, rendimento industrial e menores custos de produção, sendo considerado uma referência para os demais países produtores (VIDAL, 2010).

Produzida em quase todo o país, o plantio nacional da cana-de-açúcar ocupa uma área estimada em 8.167,5 mil hectares. Para a safra de 2010/2011, estima-se que a produção seja de 651.514,3 mil toneladas, com uma produtividade média estimada em 79.769 Kg/ha (CONAB, 2010).

No Nordeste, a cana-de-açúcar está concentrada na Zona da Mata, principalmente nos estados de Alagoas e Pernambuco (Figura 2A). A região produziu na safra 2010/2011 63.678,8 mil toneladas de cana-de-açúcar, apresentando uma produtividade média de mais de 57 mil Kg/ha, o que coloca o Nordeste na terceira posição no ranque da produção nacional (Figura 2B). Em Pernambuco a safra 2010/2011, produziu mais de 18 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, dos quais 60% são destinados à produção de açúcar e 40% destinados ao álcool (CONAB, 2010).

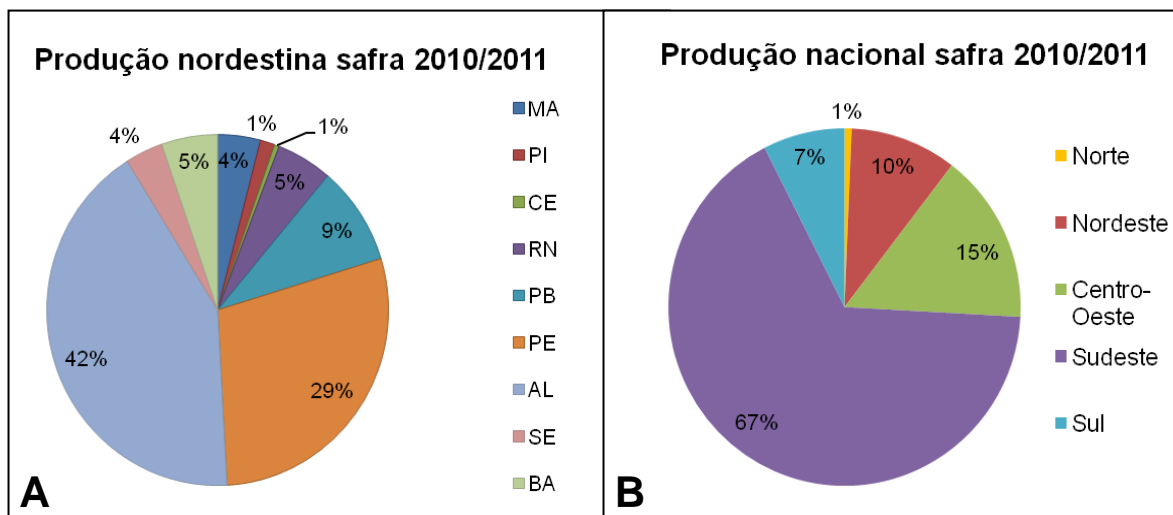


Figura 2. Produção de cana-de-açúcar da safra 2010/2011: (A) percentual da produção nordestina; (B) percentual da produção nacional. Fonte: CONAB, 2010.

Essa menor produtividade que a região Nordeste apresenta é atribuída principalmente à heterogeneidade na topografia, além da pluviosidade e, do baixo nível de investimentos em tecnologia de produção, como a utilização de materiais genéticos superiores, quantidade de fertilizantes, entre outras.

No mundo inteiro, os investimentos no melhoramento genético das culturas situam-se entre as prioridades governamentais e da iniciativa privada atuante no setor agrícola. Nesse tipo de investimento, destacam-se a utilização de materiais genéticos de qualidade superior, seja em relação ao potencial produtivo ou em relação à qualidade da matéria prima industrial, como, por exemplo, o teor de açúcares recuperáveis totais e o baixo teor de fibra.

No Brasil, particularmente no Nordeste, destacam-se as variedades RB (República Brasileira) lançadas pelo Programa Nacional de Melhoramento de Cana-de-açúcar, conduzido pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA. As variedades RB caracterizam-se por apresentarem adaptações para os diversos ambientes agroecológicos do Brasil, proporcionando níveis adequados de produtividade, além de incluir genótipos mais tolerantes ao estresse hídrico com eficiente recuperação desse estresse e mais resistentes a doenças graves, como a ferrugem marrom e o carvão (RIDESA, 2005; RIDESA, 2010). Nesse contexto, o acervo varietal da RIDESA conta com 78 variedades com aptidões de cultivo para todo o Brasil.

2.3 Micropropagação

A multiplicação comercial de um grande número de espécies representa um dos maiores sucessos na utilização da tecnologia da cultura de tecidos. O mercado que utiliza a técnica de micropropagação gera milhões de dólares e é praticado em todo o mundo (RANI e RAINA, 2000).

Também conhecida como propagação vegetativa *in vitro*, a micropropagação é a técnica mais difundida no cultivo *in vitro* de plantas. Consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos, através de um explante coletado de uma planta matriz, resultando na produção de uma grande quantidade de plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Os explantes extraídos de variadas partes da planta, tais como folhas, raízes, segmentos nodais, gemas axilares, gemas florais e apicais são cultivados assepticamente em meios nutritivos com composição adequada, possibilitando a regeneração direta da planta (MALAJOVICH, 2004).

De acordo com o tipo de explante utilizado, a micropropagação pode ser conduzida de três maneiras: (1) a partir da multiplicação por meio de gemas, o qual envolve o isolamento de órgãos meristemáticos; (2) a partir da multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta; (3) ou a partir da multiplicação via embriogênese somática (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O princípio básico da cultura de tecidos é a aplicação da totipotência celular, propriedade inerente à célula vegetal, definida pela capacidade de regenerar plantas a partir de células isoladas não diferenciadas, ou a partir de órgãos e tecidos vegetais (RAMALHO, SANTOS e PINTO, 2004). Trata-se de um método de propagação econômico, pois a produção de plantas é grande, podendo estas serem armazenadas em pequenos espaços e por longos períodos; e eficiente, produzindo plantas livres de patógenos, sendo portanto, universalmente utilizado para produção de mudas (CHANNARAYAPPA, 2007).

A micropropagação pode ser aplicada na produção em larga escala de plantas, na produção intensiva de novas variedades e espécies, na manutenção de bancos de germoplasma e na limpeza clonal, o que promove a produção de mudas fitossanitariamente saudáveis (TOMBOLATO e COSTA, 1998). Além disso, ela é utilizada com sucesso na conservação de espécies vegetais raras ou ameaçadas pelo processo de extinção (ZORNIG, 1996) e nos programas de melhoramento

genético, possibilitando a captura e fixação de componentes aditivos e não aditivos da variância genética, através da propagação clonal (GUERRA e NODARI, 2006).

A primeira aplicação comercial da micropropagação foi realizada por Morel no ano de 1960, quando obteve plantas de *Cymbidium* livres de vírus, usando ápices caulinares como explante (PIERIK, 1990). Ultimamente, a técnica de micropropagação tem sido aplicada em cerca de 1000 espécies vegetais incluindo plantas cultivadas, ornamentais, medicinais, aromáticas e árvores (MEHROTRA et al., 2007).

Pesquisas com cana-de-açúcar demonstram que a micropropagação tem facilitado a multiplicação de novas variedades melhoradas, garantindo a produção de mudas livres de pragas e doenças, transmissíveis pelos sistemas tradicionais de propagação (GEIJSKES et al., 2003) e sobretudo, reduzindo o tempo necessário para a produção de mudas. Essa redução que a propagação *in vitro* oferece é bastante vantajosa, considerando que um dos maiores problemas enfrentados em programas de melhoramento genético convencional nessa cultura é justamente a dificuldade de multiplicar o material selecionado com rapidez (DONATO et al., 2005).

2.3.1 Sistema tradicional de micropropagação

O sistema tradicional de micropropagação consiste na introdução de um explante *in vitro* e na posterior multiplicação de plantas (Figura 3). Geralmente os frascos utilizados no processo de multiplicação possuem a capacidade de comportar de uma a 15 plantas.

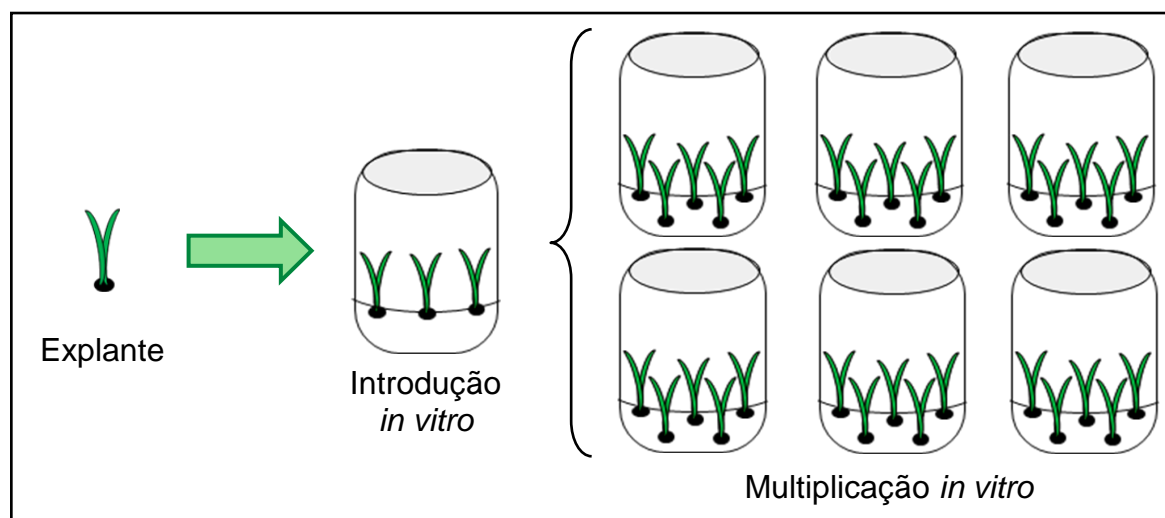


Figura 3. Sistema tradicional de micropropagação.

Os meios nutritivos utilizados tanto nesse sistema de micropropagação como em outros sistemas fornecem substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*, apresentando algumas variações para atender às necessidades específicas de cada espécie (CALDAS, HARIDASAN e FERREIRA, 1998).

O estado físico desses meios pode ser líquido ou semisólido. Este último resulta da adição de agentes gelificantes, como o agar, (polissacarídeo produzido a base de algas marinhas) ou de outros agentes como a goma gellan (polissacarídeo proveniente de fermentação bacteriana), conhecida comercialmente como Gelrite ou Phytigel. No sistema tradicional de micropropagação, a maioria das espécies são cultivadas em meios com consistência gelatinosa, facilitam no posicionamento dos explantes, que são mantidos estáticos e de forma vertical dentro dos frascos (LEMOS, 2009).

Apesar de promover condições ideais de suporte para as plantas, a absorção dos nutrientes dos meios semisólidos só ocorre pelas partes da planta que estão em contato direto com o meio (LEMOS et al., 2001; CHANNARAYAPPA, 2007). Para minimizar os custos durante a micropropagação, facilitar o preparo dos meios nutritivos e a manipulação das culturas *in vitro*, pesquisadores têm buscado soluções alternativas que incluem a redução ou supressão de componentes do meio, como os agentes gelificantes. Destaca-se a utilização de meios líquidos estáticos (GALVANESE et al., 2007; MENGARDA et al., 2009; BARBOZA et al., 2009), meios líquidos sob agitação (ARIMURA, FINGER e CASALI, 2000; PEREIRA e FORTES, 2003; CIDADE et al., 2006) e a micropropagação em sistemas de imersão temporária (DAMIANO et al., 2002; COLMERNARES e GIMÉNEZ, 2003; SCHEIDT et al., 2009a,b).

2.3.2 Sistema de biorreator de imersão temporária (BIT)

No sistema de imersão temporária idealizado por Teisson e Alvard (1994), o material vegetal permanece imerso no meio líquido, ocorrendo ciclos de drenagem em intervalos regulares. Através de um sistema de bombeamento de ar, o meio nutritivo líquido, que fica armazenado em um recipiente próprio, é transferido periodicamente para o recipiente onde estão acomodados os explantes, os quais ficam submersos por um período pré-estabelecido (Figura 4). Na propagação *in vitro*, o contato do meio de cultura com o explante e a sua oxigenação são fatores

fundamentais na capacidade micropropagativa dos explantes (LEMOS, 1996). Dessa maneira, quanto maior a área de contato do explante com o meio de cultura, maior a absorção dos componentes do meio pelo material vegetal, o que favorece a taxa de assimilação, crescimento e multiplicação de brotos e, ainda, acúmulo de massa seca (SANDAL, BHATTACHARYA e AHUJA, 2001; PEREIRA e FORTES, 2003).

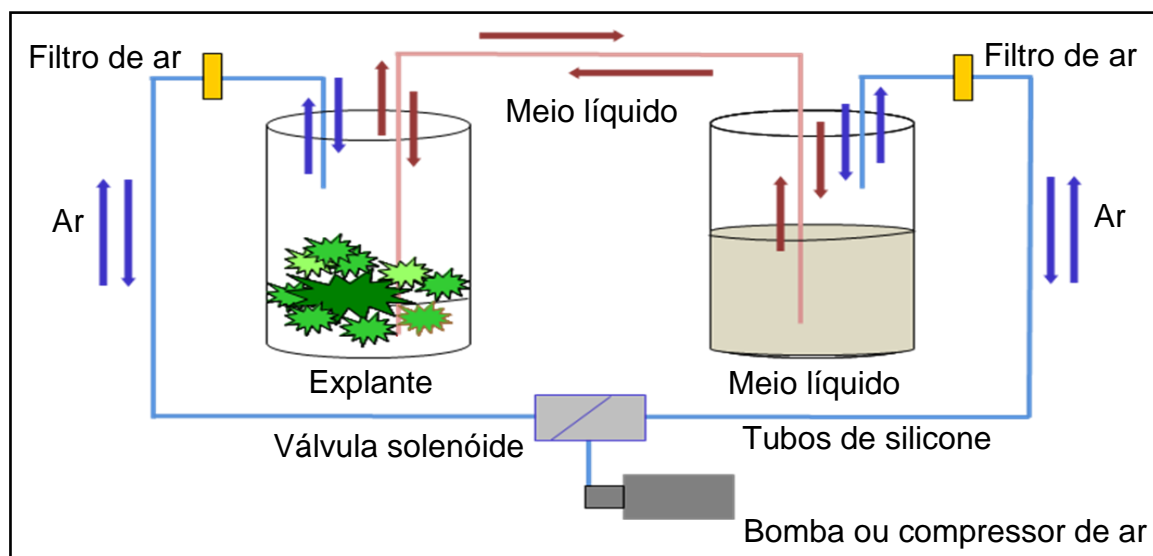


Figura 4. Sistema de biorreator de imersão temporária (BIT). Fonte: Lemos, 2009.

Os primeiros biorreatores originaram-se de equipamentos denominados fermentadores, os quais eram utilizados no cultivo de fungos e bactérias com fins industriais (TEIXEIRA, 2002). O primeiro relato sobre o uso de biorreatores para fins de propagação vegetal foi realizado por Takayama e Misawa (1981), os quais utilizaram a nova técnica para a micropropagação de begônia.

Os sistemas de imersão temporária e outros biorreatores têm sido utilizados quando se deseja aumentar a taxa de multiplicação e diminuir o custo de produção, uma vez que nesses sistemas verifica-se uma menor manipulação e transferência dos explantes, em relação aos sistemas tradicionais (GEORGE, 1993).

Nesse tipo de sistema foi verificado que a introdução de plantas de cana-de-açúcar em três biorreatores produziu, no final de 90 dias (três subcultivos), um total de 60.000 plantas distribuídas em 150 BITs (SILVA et al., 2010). A redução no tempo requerido para propagação e o aumento na produção de mudas de cana-de-açúcar também foram observadas por Lemos et al. (2002) e puderam ser ainda verificadas em diversas espécies, como mandioca (OSPINA et al., 2002), inhame (JOVA et al., 2008), abacaxi (FEUSER et al., 2003), pera, maçã e morango

(DAMIANO et al., 2003), banana (ESQUEDA e ALVARADO, 2007), orquídea (YOUNG et al., 2004), antúrio e copo de leite (RUFFONI e SAVONA, 2005), helicônia (RODRIGUES et al., 2006), dentre outras.

Além de sua ampla utilização nos processos de propagação vegetal, o sistema de biorreatores de imersão temporária, também pode ser empregado na produção de metabólitos secundários, por meio do cultivo de suspensões celulares e cultura de raízes (LEMOS, 2009). Essas substâncias são compostos orgânicos sintetizados por diferentes rotas metabólicas, originando grupos quimicamente distintos como os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ e ZEIGER, 2004).

2.4 Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são compostos naturais (fitormônios e substâncias naturais de crescimento) ou sintéticos (regulador sintético) que exibem atividade no controle do crescimento e desenvolvimento da planta (TAGLIACOZZO, 1998; TAIZ e ZEIGER, 2004). A sua utilização no cultivo *in vitro* tem como principal função suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz, estimulando respostas como crescimento, alongamento, enraizamento ou multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 2006).

A composição e concentração dos reguladores de crescimento são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento dos explantes (CALDAS, HARIDASAN e FERREIRA, 1998). A possibilidade de produção dos reguladores vegetais beneficiou de forma extraordinária a cultura de tecidos e definiu o sucesso da micropropagação clonal de plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Porém o seu perfeito desempenho está subordinado tanto à concentração e estabilidade no meio de cultura, durante a sua manipulação, quanto à translocação e ao metabolismo que ocorre nos tecidos durante o período de cultivo (TAGLIACOZZO, 1998). Raven, Evert e Eichhorn (2007) destacam que as respostas dos reguladores de crescimento não dependem somente da sua estrutura química, mas também de como ele é identificado pelo tecido alvo, sendo possível que um mesmo hormônio produza respostas diferentes em diferentes tecidos ou em diferentes fases do desenvolvimento em um mesmo tecido. Dessa forma, o tipo de regulador de crescimento e a concentração utilizada variam de acordo com o explante e a finalidade do trabalho.

Há pouco tempo acreditava-se que os reguladores vegetais poderiam ser classificados em cinco grupos ou classes: auxinas (envolvidas no aumento celular); citocininas (responsáveis pela citocinese ou divisão celular); giberelinas (relacionadas com o alongamento celular); ácido abscísico (envolvido com respostas fisiológicas para proteção das plantas, em condições de estresse) e etileno (relacionado a efeitos fisiológicos no crescimento e desenvolvimento das plantas). Entretanto, compostos que podem interferir no crescimento e desenvolvimento vegetal, como os brassinosteroides (relacionado com o alongamento e a divisão celular), as poliaminas (envolvidas com várias rotas metabólicas essenciais ao funcionamento celular), o ácido jasmônico (responsável pelo controle do crescimento de determinadas partes das plantas) e o ácido salicílico (envolvido na defesa das plantas contra o ataque de microorganismos), têm sido considerados reguladores (TAIZ e ZEIGER, 2004; COLLI, 2008).

As auxinas e as citocininas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (CALDAS, HARIDASAN e FERREIRA, 1998). A razão entre citocinina e auxina, regula a morfogênese de tecidos *in vitro*. Altas concentrações de auxina estimulam a formação de raízes, altas concentrações de citocinina estimulam a formação de parte aérea e o equilíbrio entre os dois reguladores produz células indiferenciadas (TAGLIACOZZO, 1998; COLLI, 2008).

Entre as auxinas utilizadas na cultura de tecidos, estão o ácido 3-indolacético (AIA), o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o ácido indolbutírico (AIB), o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropico-línico (picloram), o ácido (4-clorofenoxi)acético (ApCFA) e o ácido naftoxiacético (ANOA). Em relação às citocininas são utilizados o 6-benzilaminopurina (BAP), a cinetina (CIN), a isopenteniladenina (2iP), a zeatina (ZEA), o Tidiazuron (TDZ) e o (6-benzilamino)-9-2-tetraidropiranyl-9H-purina (PBA), sendo as três primeiras as mais empregadas (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

Em cana-de-açúcar, a combinação de duas citocininas (BAP e cinetina), nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,1 mg L⁻¹ respectivamente, proporcionou melhores resultados durante o cultivo de meristemas apicais da variedade RB857515 (VIEIRA et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos na micropropagação das variedades SPF-234 e HSF-240 (CHEEMA e HUSSAIN, 2004) e nas variedades CPF-237, CP-77-400, como também na variedade HSF-240 (KHAN et al., 2009). Por outro lado, combinações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP com 0,5 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) contribuíram de forma mais eficiente na formação de brotos na

variedade Isd-28 de cana-de-açúcar (BAKSHA et al., 2002). Esses resultados corroboram com Grattapaglia e Machado (1998), os quais afirmam que das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP, que é um regulador sintético, geralmente apresenta os melhores resultados.

2.5 Estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os níveis endógenos de compostos antioxidantes e compostos oxidantes ocasionando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species - ROS) (CASSELS e CURY, 2001). As ROS são subprodutos do metabolismo celular regular, que podem provocar danos à estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos, proteínas, além de outros componentes celulares (NUNES, OLIVEIRA e MORAIS, 2006).

Apesar de provocar danos, as ROS, quando em baixas concentrações, atuam como moléculas sinalizadoras nos processos de crescimento e desenvolvimento celular (DEL RÍO et al., 2006). Alguns autores destacam a capacidade destas moléculas induzirem mudanças no padrão de expressões gênicas, no metabolismo celular, na totipotência, na competência embriogênica, apresentando importância fundamental na sinalização do crescimento e desenvolvimento das plantas, além de atuarem na sinalização do estresse (OBERT et al., 2005; BLAZQUES et al., 2009).

A produção desse tipo de subproduto ocorre naturalmente em organelas como os cloroplastos e mitocôndrias (SOARES e MACHADO, 2007), em decorrência de fatores ambientais de estresse, como exposição a níveis elevados de sais, metais pesados, luminosidade, seca, temperatura, radiação ultravioleta, poluição do ar, herbicidas, bem como estresses bióticos, como ataque de patógenos (MALLICK e RAÍ, 1999).

Algumas ROS são classificadas como radicais livres, os quais são espécies químicas, geralmente muito reativas, que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados na sua estrutura, fazendo com que reajam avidamente com moléculas biológicas (PRASAD, 2004; BORA et al., 2005).

Durante o processo de respiração celular, o oxigênio molecular (O_2) é completamente reduzido por quatro elétrons transportados ao longo da cadeia respiratória, gerando duas moléculas de água (SOARES e MACHADO, 2007). Porém, durante esse processo uma pequena quantidade de elétrons escapa

ocorrendo uma redução parcial do O_2 e a consequente geração de espécies reativas de oxigênio. A redução parcial do O_2 , com um, dois ou três elétrons (Figura 5), resulta na formação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}), respectivamente (BARTOSZ, 1997; MITTLER, 2002).

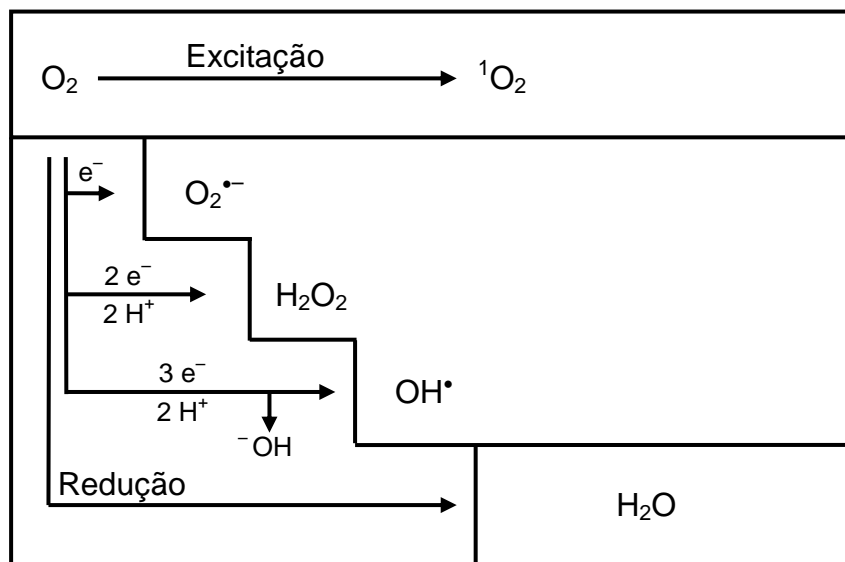


Figura 5. Formação de espécies reativas de oxigênio: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}). Fonte: adaptado de Bartosz, 1997.

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é um radical livre moderadamente reativo, com uma meia-vida de aproximadamente 2-4 milissegundos e é prontamente dismutado a H_2O_2 pela superóxido dismutase (PRASAD, 2004).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula moderadamente reativa, que pode atravessar distâncias consideráveis, produzida nas vias metabólicas normais que ocorrem no cloroplasto, mitocôndria, peroxisomos e citoplasma (LIBIK et al., 2005; VRANOVÁ et al., 2002). O H_2O_2 age numa rota dupla nas plantas: é tóxico quando sua concentração é elevada e em pequenas concentrações atua como mensageiro molecular envolvido na sinalização adaptativa a vários estresses abióticos (KARPINSKI et al., 1999; DAT et al., 2000).

O radical hidroxila (OH^{\bullet}) é formado a partir do H_2O_2 através das reações de Haber-Weiss ou de Fenton, pela utilização de catalisadores metálicos como o Fe^{2+} , considerado o mais reativo dos radicais (CHANDRU et al., 2003). Por não existirem mecanismos enzimáticos que consigam eliminar esse radical, o seu excesso pode ocasionar a morte celular (VAN BRESEUGEN et al., 2001; VRANOVÁ et al., 2002).

Além das ROS citadas, outras duas conhecidas são o oxigênio singlete (1O_2), que é uma molécula altamente reativa, formada pela excitação do O_2 molecular e o

radical hidropéroxido (HO_2^*), o qual é formado a partir da protonação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em soluções aquosas, e pode atravessar membranas biológicas e subtrair átomos de hidrogênio de ácidos graxos polinsaturados e hidropéroxidos de lipídios, disparando a auto-oxidação de lipídios (BARTOSZ, 1997; NEILL et al., 2002).

2.6 Sistema antioxidativo

Os organismos durante o ciclo de vida estão sujeitos a reações de desequilíbrio, que levam a formação de radicais livres, que por sua vez podem provocar vários danos celulares quando interagem com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios e proteínas (PRASAD, 2004).

Para impedir ou equilibrar esse tipo de dano, as células vegetais desenvolveram mecanismos de defesa, bastante sensíveis às condições de estresse. Um exemplo é a proteção por antioxidantes primários, denominados de enzimas do sistema antioxidativo, como as superóxidos dismutases (SOD), catalases (CAT), peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO), peroxidase do ascorbato (APX) e glutathione redutase (GR). E outra forma é através de antioxidantes secundários tais como vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) e compostos fenólicos (PRASAD, 2004).

As superóxidos dismutases (SOD, E.C. 1.15.1.1) são metaloenzimas que catalisam a transformação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em oxigênio molecular e H_2O_2 (MARTINEZ Y HUAMAN, 1995). De acordo com o íon metálico presente no sítio ativo, as superóxidos dismutases são classificadas em três grupos: (1) CuSOD, ZnSOD (enzima superóxido dismutase contendo cobre e zinco, respectivamente), localizadas no citosol e cloroplastos; (2) FeSOD (enzima superóxido dismutase contendo ferro), presente nos cloroplastos, e (3) MnSOD (enzima superóxido dismutase contendo manganês), encontradas nas mitocôndrias e peroxissomas (ALSCHER et al., 2002; CAVALCANTI, 2002).

As catalases (CAT, E.C. 1.11.1.6) são oxidoredutases encontradas nos glioxissomos e principalmente nos peroxissomos, onde estão envolvidas em mecanismos enzimáticos primários, como a eliminação do H_2O_2 formado pela oxidação do glicolato na fotorrespiração (HAVIR e MCHALE, 1987; PEIXOTO, 1998).

As peroxidases (POD, E.C. 1.11.1.7) são um grupo de isoenzimas, compostas por uma cadeia peptídica contendo um grupo heme, que diferem na especificidade

pelo substrato, na composição aminoacídica e na sua localização nos tecidos das plantas (QUESADA et al., 1990; PEIXOTO, 1998). Essas enzimas podem ser ácidas ou básicas. As peroxidases básicas atacam doadores de elétrons usando radicais peróxidos livres como substrato e, dessa forma, atuam como agentes de desintoxicação, já as ácidas, localizam-se nas paredes celulares, estando também associadas às membranas, organelas e ao citossol (GASPAR et al., 1985; SIEGEL, 1993). Estão envolvidas na biossíntese de etileno e ligninas (ASADA, 1992), em processos morfológicos nos vegetais (SOUZA, 2002) e possuem a capacidade de utilizar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para oxidar uma ampla quantidade de doadores de hidrogênio, assim como substâncias fenólicas, ácido ascórbico, nitrito, aminas e alguns íons inorgânicos (REGALADO et al., 2004).

A enzima polifenoloxidase (PPO, E.C. 1.14.18.1) é também denominada de tirosinase, polifenolase, fenolase, catecol oxidase, creolase ou catecolase, dependendo dos substratos utilizados na reação de escurecimento dos tecidos vegetais (SILVA, ROSA e BOAS, 2009). Na presença de oxigênio molecular, essa enzima catalisa a hidroxilação de monofenóis a o-difenois (atividade monoxigenase, E.C. 1.14.18.1), a oxidação de o-difenois a o-quinonas (atividade difenoloxidase, E.C. 1.10.3.1), e a oxidação de p-difenois a p-quinonas (atividade lacase, E.C. 1.10.3.2) (ZAWISTOWSKI, BILIADERIS e ESKIN, 1991). Juntamente com a POD, a PPO conduz a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo do local da descompartimentalização celular provocada por patógenos ou por ferimentos nos tecidos vegetais (CAMPOS et al., 2004).

A peroxidase do ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11) é uma enzima que possui alto grau de especificidade para o ácido ascórbico como doador de elétrons, estando envolvida em mecanismos de eliminação do H_2O_2 e de hidroperóxidos orgânicos (ASADA, 1992; AMAKO et al., 1994). É considerada a enzima mais importante na eliminação do H_2O_2 de certos compartimentos celulares, como os cloroplastos, onde não existem catalases para atuar nessa função (MITTLER, 2002).

A enzima glutathiona redutase (GR, EC 1.6.4.2) é uma enzima responsável pela regeneração da glutathiona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Essa enzima possui um importante papel na proteção do cloroplasto contra danos oxidativos, mantendo a razão entre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) (GALLEGO, BENAVIDES e TOMARO, 1996a,b). De acordo com Pompeu (2005) a

GSH é o componente tiol mais abundante nos vegetais, essencial para plantas e animais em resposta a estresses oxidativos, tendo um papel importante como antioxidante, na síntese de fitoquelatinas e promovendo a remoção do H₂O₂ dos cloroplastos.

2.7 Variação somaclonal

Na micropropagação, é esperado que todas as plantas produzidas, ou clonadas, possuam o mesmo genótipo da planta matriz. Entretanto, durante o processo micropropagativo é possível observar a ocorrência de variantes, que podem ter origem epigenética ou genética, sendo esta última, denominada de variação somaclonal (AHUJA, 1987; PESCHKE e PHILLIPS, 1992).

As variações epigenéticas ou de desenvolvimento são as variações temporárias que incluem alterações fenotípicas, devido à expressão de genes específicos no âmbito de um conjunto particular de condições e envolvem mudanças nas características fenotípicas e bioquímicas (MEHROTRA et al., 2007). Muitas vezes esse tipo de variação é instável e pode desaparecer após a remoção das plantas do meio e das condições em que se encontram (KAEPPLER et al., 2000). Em *Dioscorea alata*, por exemplo, foi observada a formação de brotações anormais durante o cultivo *in vitro*, porém após quatro a seis semanas de aclimatização, o desenvolvimento dos brotos voltou ao normal (RODRÍGUEZ, CORRÍA e ABEAL, 1999).

A variação somaclonal, por sua vez, é uma variabilidade genética espontânea gerada durante a cultura *in vitro* que permite o aparecimento de indivíduos diferentes da planta matriz (LARKIN e SCOWCROFT, 1981). Esse tipo de variação eventualmente é relatado, tendo capacidade de alterar diversas características como pigmentação, produção de alcaloides, mudanças na produção e habituação a auxinas e citocininas, bem como pode provocar alterações morfológicas e no crescimento das plantas (LARKIN e SCOWCROFT, 1981). Os primeiros relatos do surgimento de variação somaclonal ocorreram em plantas de cana-de-açúcar, regeneradas a partir de cultivos somáticos e em somaclones de batata (LINDSEY e JONES, 1992).

As variações somaclonais são hereditárias e podem provocar modificações no número cromossômico, repetições seriadas de sequências instáveis, deleções, endopoliploidia, intercâmbio entre as cromátides-irmãs, rearranjos do genoma ou

substituição de nucleotídeos (DEVERNO et al., 1994; KAWATA et al., 1995; JALIGOT et al., 2000).

Apesar de ser indesejável durante a propagação clonal ou conservação de germoplasma, a variação somaclonal surge como uma ferramenta para os programas de melhoramento genético de plantas. Colaboram na seleção de materiais de interesse agrônômico, como a geração de novas variedades que podem apresentar resistência a doenças, maior produtividade e qualidade, adaptação a diferentes ambientes, tolerância a estresse hídrico e a altas temperaturas (FERREIRA, CALDAS e PEREIRA, 1998).

Diversas variáveis podem influenciar no surgimento de variações somaclonais. Fatores como o genótipo, o tipo de explante, o número e a duração de subcultivos, as condições físicas do cultivo, a composição do meio nutritivo, o uso indevido de certos agentes mutagênicos e o tratamento com certos reguladores de crescimento, tendem a aumentar a frequência da variação somaclonal (BAIRU et al., 2006; CHANNARAYAPPA, 2007).

As ROS, geradas pelo estresse oxidativo, por exemplo podem reagir com diversos metabólitos, enzimas e ácidos nucleicos causando: (1) danos oxidativos, que se expressam em hipo ou hipermetilação do DNA; (2) deleções e substituições de bases do DNA; (3) alterações cromossômicas (aneuploidia e poliploidia), e (4) rearranjos cromossômicos (CASSELLS e CURY, 2001). Além disso, compostos de natureza fenólica como as furanocumarinas fotoativadas, podem se inserir na dupla hélice de DNA e se ligar às bases pirimídicas, bloqueando a transcrição e o reparo do DNA (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Dessa forma, um monitoramento do material vegetal durante a micropropagação é de valiosa importância, para que o material produzido tenha qualidade e acima de tudo fidelidade genética. O acompanhamento da fidelidade genética pode ser feita por intermédio de várias técnicas, dentre elas destacam-se os sistemas isoenzimáticos e os marcadores moleculares (FEUSER, 2003).

2.8 Uso de marcadores moleculares

Até meados da década de 60, os estudos genéticos eram realizados através de marcadores morfológicos, os quais ajudaram no desenvolvimento das primeiras versões de mapas genéticos (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998). Com o surgimento de técnicas modernas, que permitem fazer distinção diretamente em

nível de DNA, os estudos moleculares ganharam mais espaço e contribuíram para os avanços científicos.

Os marcadores moleculares são, em geral, sequências de nucleotídeos ou proteínas que revelam uma região ou regiões do genoma, ligadas a alguma característica de interesse (SILVA et al., 2009). Diversos tipos de marcadores moleculares são utilizados em programas de melhoramento, permitindo aos melhoristas acessar o genótipo da planta, identificando e selecionando a variabilidade em nível de DNA (ABDELNOOR et al., 1995).

Segundo Daugrois et al. (1996), esses tipos de marcadores apresentam-se como ferramenta valiosa no estudo de genomas complexos como o da cana-de-açúcar. A sua utilização na seleção de características de interesse econômico, durante os primeiros estádios de melhoramento, como na escolha dos melhores parentais, podem reduzir significativamente o tempo de desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 2006).

Quando comparados aos marcadores morfológicos, os marcadores moleculares podem revelar alto nível de polimorfismo por loco, são neutros em relação aos efeitos fenotípicos, com efeito epistático ou pleiotrópico mínimo ou nulo. Muitos são codominantes e podem ser utilizados para caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de amostras de células ou tecidos, em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Conforme a metodologia utilizada, os marcadores moleculares podem ser classificados de duas formas: marcadores baseados na hibridação com sondas específicas, como o RFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) e os marcadores com base na amplificação do DNA via reação em cadeia da polimerase (PCR) (OLIVEIRA et al., 2007). Entre os marcadores baseados em reações de PCR, destacam-se os marcadores: RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados), SSR (Repetições de sequências simples) e ISSR (Sequência simples repetida interna), dentre outros.

O RAPD é uma técnica que se baseia na amplificação do DNA a partir da utilização de oligonucleotídeos mais curtos e de sequência arbitrária, o que elimina a necessidade do conhecimento prévio da sequência alvo. São marcadores dominantes, não permitindo a distinção de heterozigotos (SILVA et al., 2009).

Os microssatélites ou SSRs são sequências de um a seis nucleotídeos repetidos, presentes em genomas eucariotos (OLIVEIRA et al., 2007). O

polimorfismo desse tipo de marcador é revelado através da amplificação do DNA genômico total utilizando dois *primers* compostos de sequências curtas de nucleotídeos que flanqueiam e, portanto, definem o loco SSR (OLIVEIRA, 2006).

Os marcadores ISSR destacam-se como uma alternativa eficiente para caracterização de genomas complexos, desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Essa técnica requer menor concentração de DNA que as técnicas de RAPD, AFLP e SSR, além de possuir vantagens como: alto polimorfismo, reprodutibilidade, confiabilidade, rapidez, baixo custo operacional e facilidade de manuseio (DJÉ et al., 2006).

Os marcadores ISSR utilizam sequências repetidas de di, tri, tetra ou penta-nucleotídeos, como primers, comportam-se como marcadores dominantes e seguem o padrão de herança mendeliana simples (GUPTA et al., 1994). O tamanho dos fragmentos amplificados varia de 200 a 2000 pares de bases e sua alta reprodutibilidade, possivelmente é devida ao uso de iniciadores longos (16 a 25 pb), que são capazes de em uma única reação de PCR reconhecer loci múltiplos no genoma com sequências de diferentes tamanhos localizados entre duas regiões repetidas de microssatélite idênticas orientadas em direções opostas (ZIETKIEWICZ et al., 1994; REDDY, SARLA e SIDDIQ, 2002). Vêm sendo utilizados em estudos de variabilidade genética em diversas espécies como lentilha (DURÁN e PÉREZ DE LA VEGA, 2004), azeitona (TERZOPOULOS et al., 2005), feijão comum (BUSO et al., 2008), alfafa (PETOLESCU e NEDELEA, 2009), plátano (HUANG et al., 2009), capim-elefante (LIMA, 2010), maracujá (COSTA et al., 2010), entre outras.

Em cana-de-açúcar, a técnica de ISSR mostrou-se promissora no acesso da diversidade genética e identificação de fingerprinting de DNA, tendo potencial para identificar marcadores de cultivar-específicos (ALMEIDA et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados para a variedade RB92579 de cana-de-açúcar (HSIE et al., 2008).

3 REFERÊNCIAS

ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified oligomorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.18, n. 2, p. 265-273, 1995.

AHUJA, M. R. Somaclonal variation. In: BONGA, J. P.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p. 272-285.

ALMEIDA, C. M. A. et al. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1771-1776, 2009.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

AMAKO, K.; CHEN, G-X.; ASADA, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastidic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, n. 33, p. 497-504, 1994.

ARIMURA, C. T.; FINGER, F. L.; CASALI, V. W. D. Efeito do ANA e do BAP sobre o brotamento de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) em meio geleificado e líquido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 2, n. 2, p. 23-26, 2000.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 85, p. 235-241, 1992.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPQ, 1998. v. 1, p. 261-296.

BAIRU, M. W.; FENNELL, C. W.; VAN STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa AAA* cv. 'Zelig'). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 4, p. 347-351, 2006.

BAKSHA, R. et al. *In vitro* shoot tip culture of sugar-cane (*Saccharum officinarum*) variety isd 28. **Biotechnology**, Bangladesh, v. 1, n. 2-4, p. 67-72, 2002.

BARBOZA, S. B. S. C. et al. Cultivo inicial *in vitro* de gemas axilares de *Ananas comosus* (L. Merr., em meio líquido/sólido, na presença/ausência de luz. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1832-1836, 2009.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 19, n. 1, p. 47-64, 1997.

BLAZQUEZ, S. et al. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.) histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, p. 49-57, 2009.

BORA, K. et al. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (presl.) hook, Dicksoniaceae. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 6-15, jul./dez. 2005.

BORÉM, A.; SILVA, J. A.; DIOLA, V. Biologia molecular e biotecnologia. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool - tecnologias e perspectivas**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2010. cap. 12, p. 333-355.

BUSO, G. S. C. et al. **Análise da variabilidade genética de cultivares de feijoeiro comum com marcadores ISSR**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 11 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 221).

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPq, 1998. v. 1, p. 87-132.

CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

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

CAVALCANTI, F. R. **Atividade de enzimas antioxidativas e integridade de membranas em plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] submetidas ao estresse salino**. 2002. 62f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Ceará.

CHANDRU, H. K. et al. Kinetics of wound-induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth stages. **Plant Science**, Irlanda, v. 164, p. 935-941, 2003.

CHANNARAYAPPA. **Molecular biotechnology: principles and practices.** Bangalore: Universities Press, 2007. 1217 p.

CHEEMA, K. L.; HUSSAIN, M. Micropropagation of sugarcane through apical bud and axillary bud. **International Journal of Agriculture & Biology**, Pakistan, v. 6, n. 2, p. 257-259, 2004.

CIDADE, D. A. P. et al. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, mar. 2006.

COLLI, S. Outros reguladores: brassinosteróides, poliaminas, ácidos jasmônico e salicílico. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 14, p. 296-302.

COLMENARES, M.; GIMÉNES, C. Multiplicación *in vitro* *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Caracas, v. 20, n. 4, out. 2003.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2010.** Brasília: 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/ecf76fd96889c63b1368be8085214377..pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2010.

COSTA, J. L. et al. Marcadores moleculares como ferramenta para estruturação da diversidade genética em genótipos de maracujazeiro. In: JORNADA CIENTÍFICA, 4, 2010, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010.

CUENCA, M. A. G.; MANDARINO, D. C. **Evolução da atividade canvieira nos principais Municípios produtores do Estado da Paraíba; 1990, 1995, 2000 e 2005.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007. 14 p (Documentos, 114).

CUENÇA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. **Caracterização agrossocio-econômica da atividade canvieira no Brasil, distribuição espacial na produção mundial entre 1961 e 2003 - situação no Brasil nos entre 1990 e 2002.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2005. 24 p. (Documentos, 74).

DAMIANO, C. et al. Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. ***In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant***, New York, n. 39, p. 651-656, 2003.

DAMIANO, C.; FRATTARELLI, A.; GIORGIONI, M. Micropropagation of pear through temporary immersion. **Acta Horticulturae**, n. 596, p. 425-429, 2002.

DAQUINTA, M. et al. Multiplicación del banano FHIA-18 con PBZ y TDZ en diferentes formas de cultivo. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2, 1997, Gramado. **Anais...** Gramado: REDBIO, 1997. p. 115.

DAT, J. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, Oxford, v. 57, p. 779-795. 2000.

DAUGROIS, J. H. et al. Aputative major gene for rust resitance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar "R570". **Theoretical and Applied Genetics**, New York, n. 92, p. 1059-1064, 1996.

DEL RÍO, L. A. et al. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes: production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 330-335, 2006.

DEVERNO, L. L; CHAREST, P. J.; BONEN, L. Mitochondrial DNA variation in somatic embryogenic cultures of Larix. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 88, p. 727-732, 1994.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and Genome Research**, Switzerland, v. 109, p. 27-33, 2005.

DIOLA, V.; SANTOS, F. Fisiologia. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool - tecnologias e perspectivas**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2010. cap. 2, p. 25-49.

DJÈ, Y. et al. Optimization of ISSR markers for African edible-seeded *Cucurbitaceae* species genetic diversity analysis. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 2, p. 83-87, 2006.

DONATO, V. M. T. S. et al. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 134-141, jan./fev. 2005.

DURÁN, Y.; PÉREZ DE LA VEGA, M. Assessment of genetic variation and species relationships in a collection of Lens using RAPD and ISSR. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 2, n. 4, p. 538-544, 2004.

ESQUEDA, M. C.; ALVARADO, C. G. Inducción de yemas múltiples en *Musa* (AAB) Plátano "Hartón Gigante" con inmersión temporal. **Ciência**, Maracaibo, v. 15, n. 3, p. 331-340, 2007.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPq, 1998. v. 1, p. 21-43.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa - Cenargen, 1998. 220 p.

FEUSER, S. et al. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, p. 221-227, 2003.

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, Irlanda, v. 121, p. 151-159, 1996a.

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Oxidative damage caused by cadmium chloride in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **Phyton International Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 41-52, 1996b.

GALVANESE, M. S. et al. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 311, p. 63-67, 2007.

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

GASPAR, T. et al. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 64, n. 3, p. 418-423, 1985.

GEIJSKES, R. J. et al. SmartSet™ seedlings: tissue cultured seed plants for the Australian sugar industry. **Sugar Cane International**, p. 13-17, 2003.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. London: The Technology Exegetics, 1993. 574 p.

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

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de biotecnologia**. Florianópolis: 2006. p. 41. Apostila de biotecnologia, 1.

GUPTA, M. et al. Amplification of DNA from evolutionarily diverse use single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical Applied Genetics**, v. 89, p. 998-1006, 1994.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, jun. 1987.

HSIE, B. S. et al. Variação somaclonal em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54, 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p. 102.

HUANG, W. J. et al. Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 53, n. 1, p. 159-163, 2009.

JALIGOT, E. et al. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 684–690, 2000.

JOVA, M. C. et al. Multiplicación *in vitro* de segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*) en sistemas de cultivo semiautomatizado. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 10, n. 2, p. 97-103, dez. 2008.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612 p.

KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 179-188, 2000.

KARPINSKI, S. et al. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. **Science**, v. 284, p. 654–657, 1999.

KAWATA, M. et al. Structural changes in the plastid DNA of rice (*Oryza sativa* L.) during tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 364–371, 1995.

KHAN, S. A. et al. Effect of cytokinins on shoot multiplication in three elite sugarcane varieties. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v. 41, n. 4, p. 1651-1658, 2009.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variations – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 547-554, 1981.

LEBOT, V. Biomolecular evidence for plant domestication in Sahul. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 46, p. 619-628, 1999.

LEMOS, E. E. P. et al. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, dez. 2001.

LEMOS, E. E. P. **Experimentos em micropropagação e organogênese na graviola (*A. muricata* L.)**. Maceió: Editora da Universidade Federal de Alagoas, 1996. 43p.

LEMOS, E. E. P. et al. Micropropagação de cana-de-açúcar em sistema de imersão temporária (*Saccharum* spp.). In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 23., 2002, Recife. **Resumos...** Recife: Sociedade Nordestina de Botânica, 2002, p. 191.

LEMOS, E. E. P. Micropropagação de plantas por biorreatores. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. cap. 4, p. 83-119.

LIBIK, M. et al. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, p. 834-841, 2005.

LIMA, R. S. N. **Estimativa da diversidade genética entre clones de capim-elefante (*P. purpureum* Schum) baseado em marcadores de dna (RAPD e ISSR)**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

LINDSEY, K.; JONES, M. G. K. **Biotechnology vegetal agrícola**. Zaragoza: Acribia, 1992. 276 p.

MACHADO, F. B. P. **Brasil, a doce terra – História do Setor**. 2003. **Jornal Cana – Pesquisa e Desenvolvimento**. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

MALAJOVICH, M. A. **Biotechnologia**. Rio de Janeiro: Axcel Books do Brasil, 2004. 344p.

MALLICK, N.; RAÍ, L. C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to the copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 146-149, 1999.

MARTINEZ Y HUAMAN, C. A. **Efeitos dos estresses hídrico, luminoso e oxidativo em diferentes espécies de batata (*Solanum* spp.)**. 1995. 122 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2005. p. 205-251.

MEHROTRA, S. et al. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: a progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 13, p. 1484-1492, jul. 2007.

MENGARDA, L. H. G. et al. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.6, p. 469-474, nov./dez. 2009.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA Instituto Centro de Ensino Tecnológico. **Produtor de cana-de-açúcar**. 2. ed. Fortaleza: Edições Demócrito Rocha, 2004. 64 p. (Cadernos Tecnológicos).

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

NEILL, S. J. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1237-1247, 2002.

NUNES, E.; OLIVEIRA, S. C.; MORAIS, R. N. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. **Revista Ágora**, Campo Grande, v. 1, n. 6, 2006. Disponível em:

<<http://www.fes.br/revistas/agora/ojs/viewarticle.php?id=43&layout=abstract>>.

Acesso em: 02 nov. 2009.

OBERT, B. et al. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 537-547, 2005.

OLIVEIRA, A. C. B. et al. **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Campinas: Instituto Agonômico, 2007. 17p. (Documentos, 81).

OLIVEIRA, K. M. **Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-SSRs e mapeamento funcional em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2006. 165 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OSPINA, B.; SEGOVIA, R.; BEDOYA, A. Micropropagation of cassava plants through the temporary immersion system and herdening of massive numbers of cassava vitroplants. In: CASSAVA REGIONAL WORKSHOP, 7., 2002, Bagkok. **Proceedings...** Bagkok: Cassava Research and Development in Asia, 2002. p. 161-173.

PEIXOTO, P. H. P. **Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) com tolerância diferencial ao alumínio.** 1998. 112f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, set. 2003.

PESCHKE, V. M; PHILLIPS, R. L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. **Advances in Genetics**. v. 30, p. 41–75, 1992.

PETOLESCU, C.; NEDELEA. Genetic diversity analysis of the *in vitro* regenerated alfafa plants using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. **Romanian Biotechnological Letters**, Romania, v. 14, n. 6, p. 4882-4886, 2009.

PICELLI, E. C. M. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene *Ddm1* no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar.** 2010. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** Madrid: Mundi-prensa, 1990. p. 149-167.

POMPEU, G. B. **Análise da resposta antioxidativa de células *in vitro* de fumo (*Nicotiana tabacum* cv BY-2) submetidas ao metal pesado níquel.** 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PONCE, J. P. Propagación masiva de plantas: posibilidades y perspectivas. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1997, Gramado. **Anais...** Gramado: REDBIO, 1997. p. 17.

PRASAD, M. N. V. Radicales libres (FR¹) Y species reactivas del oxígeno (ROS²). In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. **La ecofisiologia vegetal: una ciencia de síntesis.** Madrid: Thompson, 2004. p. 775-790.

QUESADA, M. A. et al. Purification of an anionic isoperoxidase from peach seeds and its immunological comparison with other anionic isoperoxidases. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 79, n. 4, p. 623-628, 1990.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. Genética na agropecuária. 3. ed. Lavras: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2004. 472 p.

RANI, V.; RAINA, S.N. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. **In vitro Cell & Development Biology – Plant**, New York, v. 36, p. 319-330, 2000.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830 p.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 128, p. 9-17, 2002.

REGALADO, C.; GARCIA-ALMENDAREZ, B. E.; DUARTE-VAZQUEZ, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Review**, Netherlands, v. 3, p. 243-256, 2004.

RIDESA. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro, 2010. 136 p.

RIDESA. **Lançamento de novas variedades de cana-de-açúcar**. SIMÕES-NETO, D. E.; MELO, L. J. O. (Edit). Imprensa Universitária da UFRPE, Recife, 2005. 28 p. (Boletim Técnico, 1).

RODRIGUES, P. H. V. et al. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2006.

RODRÍGUEZ, S. M.; CORRÍA, M. G.; ABEAL, E. E. **Modificaciones morfofisiológicas en vitroplantas de ñame (*Dioscorea alata* L.)**. Bayamo Granma: Universidade de Granma, Centro de Invertigaciones Agropecuarias, n. 2, 1999. p. 63-68. Disponível em:

<[http://biblioteca.idict.villaclara.cu/UserFiles/File/ciencia/1\(6\).pdf](http://biblioteca.idict.villaclara.cu/UserFiles/File/ciencia/1(6).pdf)>.

Acesso em: 2 dez. 2010.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

RUFFONI, B.; SAVONA, M. The temporary immersion system (T. I. S.) for the improvement of micropropagation of ornamental plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 683, p. 445-454, 2005.

SANDAL, I.; BHATTACHARYA, A.; AHUJA, P. S. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 65, p. 75-80, 2001.

SCHEIDT, G. N. et al. Utilization of the biorreactor of imersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p.37-43, nov. 2009a.

SCHEIDT, G. N. et al. Multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo. **Biociências**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 82-85, dez. 2009b.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidase - an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Dorcrecht, v. 12, p. 303-312, 1993.

SILVA, M. D. A. et al. Emprego de biorreatores de imersão temporária na multiplicação de plantas de cana-de-açúcar provenientes de embriogênese somática direta. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10., 2010, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2010. 1 CD-ROM

SILVA, M. V.; ROSA, C. I. L. F.; BOAS, E. V. B. V. Conceito e métodos de controle do escurecimento enzimático no processamento mínimo de frutas e hotaliças. **Boletim Ceppa**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 83-96, 2009.

SILVA, S. A. et al. Caracterização de genótipos de fruteiras potenciais para o Nordeste brasileiro. In: CARVALHO, C. A. L. et al. **Tópicos em Ciências Agrárias**. Cruz das Almas: UFRB, 2009. v. 1, cap. 2. p. 15-24.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, Maranhão, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

SOUZA, C. C. **Influência de poliaminas no desenvolvimento de plantas de inhame (*Dioscorea sp*) cultivadas *in vitro***. 2002. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SOUZA, O.; SANTOS, I. E. **Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pelos ruminantes**. Aracajú: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002. 2 p. (Comunicado técnico, 7).

TAGLIACOZZO, G. M. D. Fitormônios e seus efeitos biológicos *in vivo* e *in vitro*. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p. 58-62. (Boletim técnico, 174).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. **Plant & Cell Physiology**, v. 22, n. 3, p. 461-467, 1981.

TEISSON, C.; ALVARD, D. A new concept of plant *in vitro* cultivation in liquid medium: temporary immersion. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., 1994, Florença. **Abstract...**, 54p.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n. 24, p. 36-41, jan./fev. 2002. Disponível em:
<<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio24/biorreat.pdf>>.
Acesso em: 24 mar. 2010.

TEJERA, N. A. et al. Comparative analysis of physiological characteristics and yield components in sugarcane cultivars. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 102, p. 64-72, 2007.

TERZOPOULOS, P. J. et al. Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n. 105, p. 45-51, 2005.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. 72 p. (Boletim técnico, 174).

VAN BREUSEGEM, F. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Irlanda, v. 161, p. 405-414, 2001.

VIDAL, M. F. **Produção e área colhida de cana-de-açúcar no Nordeste**. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE, 2010. 10 p. (Informe rural ETENE, 20).

VIEIRA, R. A. et al. Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação *in vitro* das variedades RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 122-126, jan./dez. 2009.

VRANOVÁ, E.; INZE, D. ; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1227-1236, 2002.

YOUNG, P. S.; MURTHY, H. N.; YOEUP, P. K. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 67-72, 2004.

ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. Poliphenol oxidase. In: ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. **Oxidative enzymes in foods**. London: Elsevier Science, 1991. p. 218-220.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p.176-183, 1994.

ZORNIG, R. K. Micropropagação de bromélias. **Bromélia**, n. 3, p. 3-9. 1996.

CAPÍTULO II

INSTABILIDADE FENOTÍPICA NA VARIEDADE RB872552 DE CANA-DE-AÇÚCAR: MARCADORES ISSR E ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO

Instabilidade fenotípica na variedade RB872552 de cana-de-açúcar: marcadores ISSR e enzimas do sistema antioxidativo

Gemima Manço de Melo¹, Gilvany Rodrigues de Andrade², Kaliny Veiga Pessoa da Silva¹, Cláudia Ulisses³, Reginaldo de Carvalho³, Lilia Willadino^{3*}

1. Aluna do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Rua Dom Manoel de Medeiros S/N, CEP: 52171-900. Bairro de Dois Irmãos, Recife, Pernambuco – Brasil.

2. Aluna do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Bolsista CAPES/REUNI.

3. Professor da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE.

* Autor correspondente: lilia.willadino@bol.com.br

Instabilidade fenotípica na variedade RB872552 de cana-de-açúcar: marcadores ISSR e enzimas do sistema antioxidativo

RESUMO – Desde a introdução do material *in vitro* até a etapa de aclimatização, o material vegetal é submetido a condições ambientais incomuns que podem provocar desajustes fisiológicos na planta, podendo resultar em alterações morfológicas, bioquímicas ou moleculares. Com o objetivo de avaliar as causas da desordem fisiológica observada na variedade RB872552 de cana-de-açúcar que provocou o crescimento desordenado de pequenas brotações, formando um aglomerado de brotos conhecido como “massa verde” foram realizadas análises bioquímica e molecular. A partir do surgimento das “massas verdes”, o material vegetal foi coletado do biorreator de imersão temporária e subcultivado em meio MS líquido estático, suplementado ou não com 1,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina. Os valores de atividade da catalase e da peroxidase das amostras de “massa verde” subcultivas em biorreator de imersão temporária foram superiores às atividades do material vegetal subcultivado e mantido no sistema convencional. A peroxidase do ascorbato apresentou maior atividade nas “massas verdes” cultivadas na presença de 6-benzilaminopurina nos dois sistemas de micropropagação. Os fragmentos obtidos durante a amplificação de todo o material vegetal analisado mostrou monomorfismo, sugerindo fidelidade genética do material clonado. O perfil enzimático do sistema antioxidativo associado à análise molecular evidenciam que a desordem fisiológica que resultou no surgimento das “massas verdes”, não foi provocada por variação genética e sim resultado das condições de estresse ao qual o material foi submetido.

Palavras-chave *Saccharum* spp., massa verde, 6-benzilaminopurina, variação morfofisiológica, biorreator de imersão temporária.

Phenotypic instability in sugarcane RB872552 variety: ISSR markers and enzymes of antioxidative system

ABSTRACT – Since the introduction of material to the *in vitro* acclimatization stage, the plant material is submitted to unusual environmental conditions that can cause physiological imbalances in the plant, which can result in morphological, biochemical or molecular changes. In order to assess the causes of physiological disorder observed in sugarcane RB872552 variety which caused the uncontrolled growth of small buds, forming a cluster of shoots known as "green mass" were performed biochemical and molecular analysis. From the rise of "green masses", the plant material was collected from temporary immersion bioreactor and subcultured in MS liquid medium static, supplemented or not with 1.5 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine. The values of activity of catalase and peroxidase samples of "green mass" subculture in temporary immersion bioreactor were superior to the activities of plant material subcultured and maintained in the conventional system. The ascorbate peroxidase showed higher activity in "green masses" cultured in the presence of 6-benzylaminopurine in the two micropropagation systems. The fragments obtained during amplification of the entire plant material analyzed showed monomorphism, suggesting genetic fidelity of cloned material. The profile of enzymatic antioxidative system associated with the molecular analysis showed that the physiological disorder that resulted in the emergence of "green masses" was not caused by genetic variation but a result of stress conditions to which the material was submitted.

Keywords *Saccharum* spp., green mass, 6-benzylaminopurine, morphophysiological variation, temporary immersion bioreactor.

INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma fonte impulsionadora da economia brasileira e posiciona o país como o maior produtor mundial do produto. Estima-se que na safra 2010/2011 sejam produzidos mais de 651 milhões de toneladas, das quais 45,13% serão destinadas à produção de açúcar e 54,87% à produção de álcool (Conab 2010).

A produção de mudas de cana-de-açúcar é realizada de forma convencional, utilizando-se rebolos (colmos) como unidade propagativa, ou mediante cultura de tecidos, destacando-se a micropropagação de brotos a partir de meristemas apicais. Segundo Zucchi et al. (2002), essa técnica é muito útil em programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar, devido à produção de um grande número de mudas com rapidez, o que é fundamental para multiplicação de variedades promissoras e clones. Recentemente, foi desenvolvido o cultivo em sistemas de biorreatores de imersão temporária (BIT), sistema de micropropagação idealizado por Teisson and Alvard (1994). Nesse sistema o material vegetal é imerso em meio líquido, com ciclos de drenagem em intervalos regulares. O sistema apresenta como vantagem a utilização de meio líquido, que favorece a absorção de nutrientes e hormônios (Sandal et al. 2001). Além disso, a drenagem do meio aumenta o fornecimento de oxigênio para os tecidos, incrementando o crescimento (Mehrotra et al. 2007) e a taxa de multiplicação (George 1993). Os BITs reduzem os custos de produção devido a menor manipulação e transferência dos explantes, além da supressão de gelificantes, como o agar ou gomas de gelan, na constituição do meio de cultivo (George 1993).

Na micropropagação, as mudas produzidas devem ser geneticamente idênticas à planta matriz. Contudo, o cultivo *in vitro* pode induzir alterações morfológicas nas plantas, tais como falta de alongamento dos caules (Leshen et al. 1988), crescimento em forma de roseta, (Dantas et al. 2000), coloração anormal de folhas e pseudocauls (Santos et al. 2004), hiperidricidade (Kevers et al. 2004, Saher et al. 2004) e crescimento desordenado de pequenas

brotações a partir da base da touceira. Esse aglomerado de brotos é conhecido na micropropagação de cana-de-açúcar como “massa verde” (Lee et al. 2007). As referidas alterações podem ter origem genética ou epigenética, podendo ser induzidas durante a fase de cultivo *in vitro*, em função de fatores como fonte de explante, tempo de cultivo, número de subcultivos, substâncias reguladoras do crescimento, composição do meio de cultivo e genótipo da planta (Silvarolla 1992). As variações genéticas, também denominadas de variações somaclonais são hereditárias, e além de provocar alterações morfológicas são capazes de provocar modificações no número cromossômico e alterações na sequência do DNA, resultando no aparecimento de indivíduos diferentes da planta matriz (Larkin and Scowcroft 1981, Lindsey and Jones 1992, Kaeppler et al. 2000). Já as variações epigenéticas são variações temporárias, que devido à expressão de genes específicos, podem provocar alterações morfológicas e bioquímicas (Mehrotra et al. 2007). Estas últimas incluem alterações nos sistemas enzimáticos, causando aumento ou redução na atividade das enzimas (Lima et al. 2002, Oliveira et al. 2008). No sistema antioxidativo, por exemplo, enzimas como as catalases (CAT), peroxidases (POD) e peroxidases do ascorbato (APX) possuem a função de interagir com os compostos oxidantes, para impedir ou equilibrar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que em excesso podem provocar danos celulares (Prasad 2004).

As alterações morfológicas ocorridas durante o processo de cultivo *in vitro* podem gerar grandes perdas na produção de biofábricas, como também em instituições de pesquisa. Sendo assim, a avaliação tanto a nível bioquímico quanto molecular de plantas cultivadas *in vitro* apresenta grande importância para produção de mudas geneticamente fiéis a planta matriz.

Para identificar variações genéticas, marcadores moleculares são bastante utilizados em estudos genéticos na detecção de polimorfismos diretamente ao nível do DNA, independente da interação genótipo ambiente, da idade do organismo ou do tecido analisado (Oliveira et al. 2007). Baseiam-se principalmente na amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) e têm sido grandemente empregados nos programas de

melhoramento de plantas. Dentre eles, destacam-se os ISSRs (sequência simples repetida interna), que são marcadores multiloci, produzidos por amplificação com *primers* de microssatélites de 16 a 25 pb, resultando em um padrão de DNA fingerprinting (Staub et al. 1996, Gupta and Varshney 2000). Uma das vantagens desse marcador é que ele não exige o conhecimento prévio do genoma (Gupta et al. 1994).

Devido ao surgimento de alterações de ordem morfofisiológica durante o processo de cultivo em sistema de biorreator de imersão temporária, o presente estudo teve como proposta avaliar, mediante análises enzimáticas, o nível de estresse ao qual esteve submetida à variedade RB872552 de cana-de-açúcar, além de detectar possíveis polimorfismos genéticos associados à condição de multiplicação em sistema de biorreator de imersão temporária (BIT).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e a análise molecular realizada no Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA, ambos da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Material vegetal e condições de cultivo

Plantas (Figura 1a) e “massas verdes” (Figura 1b) de cana-de-açúcar da variedade RB872552, provenientes da Biofábrica Governador Miguel Arraes, foram coletadas de três biorreatores de imersão temporária após passarem por seis subcultivos (180 dias) de multiplicação, com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP). Parte do material vegetal foi subcultivado e parte foi armazenada em freezer a -20°C para posteriores análises. O subcultivo ocorreu durante 20 dias em sistema tradicional de cultivo *in vitro*, onde o material vegetal permaneceu em frascos de vidro (6 cm de diâmetro por 14,5 cm de altura, com capacidade para 350 mL) contendo meio MS (Murashige and Skoog 1962) líquido sem agitação, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de inositol na presença ou ausência de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

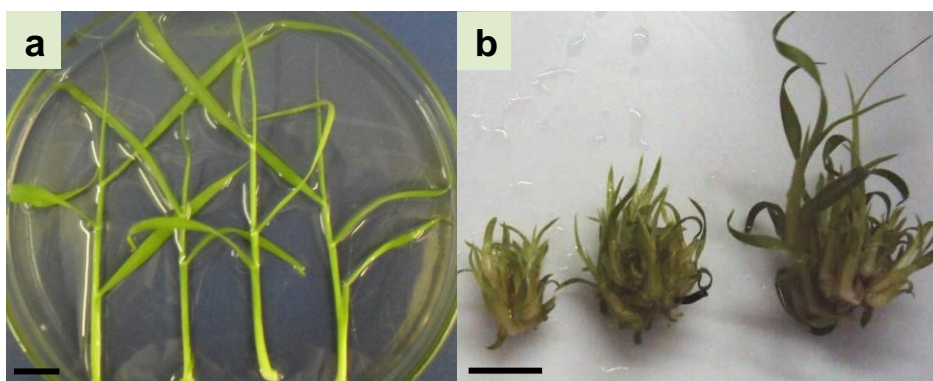


Figura 1. Material vegetal da variedade RB872552 de cana-de-açúcar proveniente do cultivo em sistema de biorreator de imersão temporária após seis subcultivos em meio MS suplementado com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP). (a) Plantas; (b) “massas verdes”. Barra: 1 cm.

O pH do meio foi ajustado para 5,8 e a esterilização realizada com hipoclorito de cálcio (CaOCl 0,1% p/v). Após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

No experimento foram definidos quatro tratamentos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados no material vegetal da variedade RB872552 de cana-de-açúcar.

Sigla	Descrição do material e tratamento
PbitB	Plantas provenientes do biorreator, subcultivadas em sistema tradicional de cultivo, meio MS contendo $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP
MbitB	Massas verdes provenientes do biorreator, subcultivadas em sistema tradicional de cultivo, meio MS contendo $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP
PbitSB	Plantas provenientes do biorreator subcultivadas em sistema tradicional de cultivo, meio MS sem adição de BAP
MbitSB	Massas verdes provenientes do biorreator subcultivadas em sistema tradicional de cultivo, meio MS sem adição de BAP

Tanto as plantas (Pbit) e “massas verdes” (Mbit) retiradas dos três biorreatores, como também as plantas e “massas verdes” provenientes dos quatro tratamentos foram utilizadas para análise bioquímica e molecular. Para a análise molecular foi utilizada, como controle, uma amostra de cana-de-açúcar RB872552 procedente do campo (AC) da Usina São José localizada no município de Igarassu – Pernambuco/PE.

Análises bioquímicas

Para a determinação das atividades enzimáticas, foram utilizados 500 mg de tecido vegetal fresco proveniente de três repetições de cada tratamento. O material vegetal foi homogeneizado com nitrogênio líquido em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,5) com 50 mg de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm a uma temperatura de 4°C durante 10 minutos (modificado de Zeraik et al. 2008). Em seguida, foi retirado o sobrenadante e armazenado em freezer a -20°C . A leitura dos extratos foi

realizada em espectrofotômetro da Biospectro UV/VIS, modelo SP-220. Foram feitos extratos das plantas e “massas verdes” procedentes dos quatro tratamentos e plantas e “massas verdes” provenientes diretamente de cada um dos três biorreatores.

A determinação das proteínas totais solúveis foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (1976).

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11) foi determinada pela diminuição do ascorbato e mensurada pela mudança na absorbância a 290 nm, no intervalo de 1 minuto (Nakano and Asada 1981). A reação foi constituída por uma solução contendo 1,335 mL de tampão fosfato de potássio a 50 mM (pH 6,0); 0,075 mL de ácido ascórbico a 10 mM; 0,075 mL do extrato enzimático e 0,015 mL de H₂O₂ a 100 mM.

Para a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), a decomposição do peróxido de hidrogênio foi observada pelo declínio da absorbância a 240 nm por minuto (Berris and Sizer 1952). A reação foi constituída por uma solução contendo 1,39 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0); 0,05 mL do extrato enzimático e 0,06 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 500 mM.

A determinação da peroxidase (POD, E.C. 1.11.1.7) foi estimada de acordo com o aumento da absorbância pela oxidação do guaiacol e redução do peróxido de hidrogênio. A solução foi constituída por 1,35 mL de guaiacol (0,05 M); 0,1 mL do extrato enzimático e 0,05 mL de H₂O₂ a 10,3 mM (Fatibello-Filho and Vieira 2002).

O desenho experimental utilizado na análise bioquímica foi inteiramente casualizado. Foram avaliadas três repetições (uma de cada biorreator) das plantas (Pbit) e “massas verdes” (Mbit) retiradas diretamente de três biorreatores, como também as plantas e “massas verdes” provenientes dos quatro tratamentos. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), por meio do software Assistat 7.5 beta (Assis and Silva 2008), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Análise molecular

Extração e quantificação de DNA genômico

Foram coletadas folhas para extração de DNA, seguindo-se a metodologia de Doyle and Doyle (1990). A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% com tampão TAE (1X), com tensão constante de 80 volts, sendo visualizada e fotografada sobre luz ultravioleta. Todas as amostras foram aliqüotadas a 5 ng/μl para utilização em reações de PCR.

Amplificação por PCR e análise dos polimorfismos gerados

Um conjunto de 42 oligonucleotídeos iniciadores (olii) ISSR UBC (University of British Columbia), foi testado para amplificação via PCR. O marcador ISSR seguiu o protocolo de Bornet and Branchard (2001) com modificações para o presente estudo.

As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 20 μL contendo: 0,3 μL de Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Sciences); 1,5 μL de tampão de enzima Taq 1X; 0,5 μL de dNTP; 1,5 μL de MgCl₂; 1,0 μL do *primer*; 1,0 μL de DNA genômico e 14,2 μL de água Milli-Q estéril.

O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50-60°C (dependendo do *primer*) por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguida de extensão final por 7 minutos a 72°C. Os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE (1X), com tensão constante de 80 volts, sendo visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises bioquímicas

A atividade da catalase (CAT) e da peroxidase (POD) foi maior nas “massas verdes” (Mbit) que vieram diretamente do sistema de biorreator de imersão temporária (Figura 2a e 2b). As catalases e as peroxidases são enzimas que utilizam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como substrato. O H_2O_2 , por sua vez, age em rota dupla nas plantas, em altas concentrações promove a morte celular programada, enquanto que em baixas concentrações atua como um mensageiro secundário envolvido na sinalização adaptativa a vários estresses abióticos, tendo capacidade de influenciar a expressão de mais de 100 genes em plantas (Dat et al. 2000, Desikan et al. 2001).

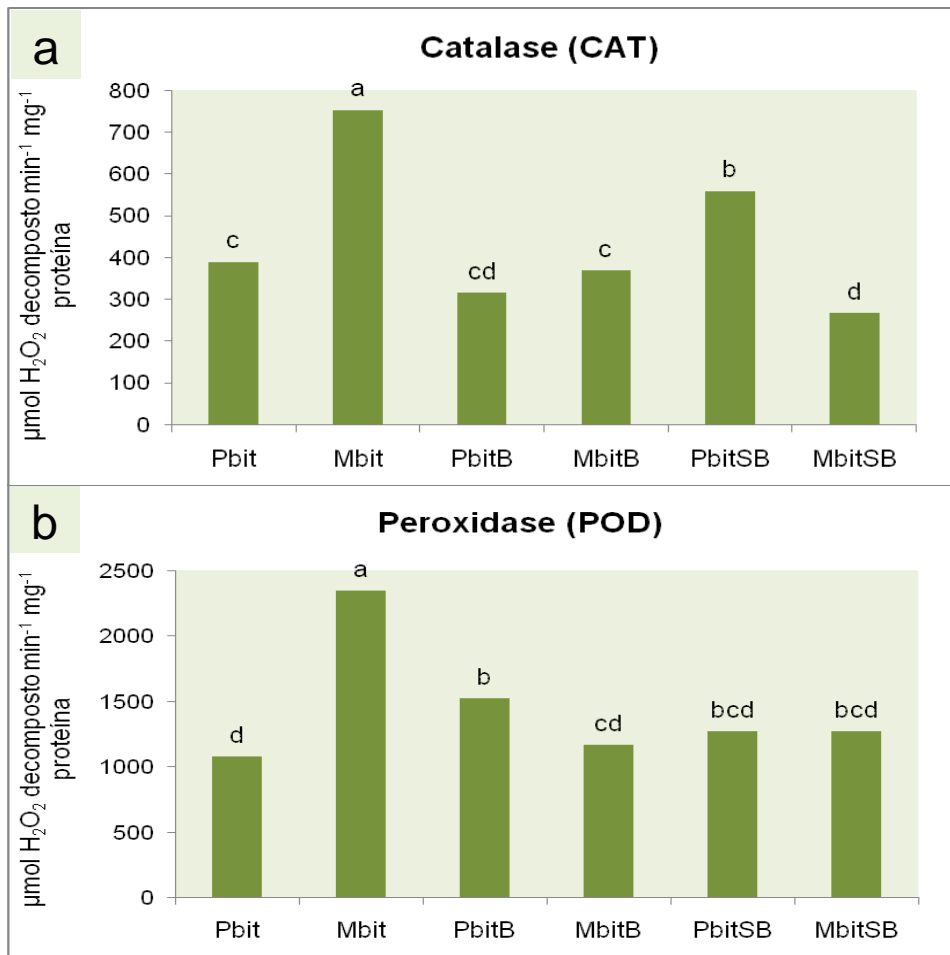
Essa elevada atividade das enzimas do sistema antioxidativo indica a situação de estresse ao qual estava submetido o material vegetal. As “massas verdes” cultivadas nos biorreatores ficaram imersas, periodicamente, no meio líquido aumentando a superfície de contato da “massa verde” com os componentes do meio de cultivo, inclusive o BAP. As “massas verdes” quando transferidas para o sistema tradicional de cultivo *in vitro*, suplementado ou não com o regulador de crescimento (MbitB e MbitSB, respectivamente), apresentaram uma redução de aproximadamente 50% na atividade da CAT e da POD (Figura 2a e 2b). Ziv (1995) destaca que o desempenho assimilatório das plantas durante o período de cultivo *in vitro* também está relacionado ao estado físico do meio de cultura.

O incremento da atividade da POD, geralmente ocorre durante a fase de máxima divisão celular (Piza 2000) e em resposta ao estresse *in vitro*, em consequência de vários fatores, entre eles os reguladores de crescimento (Siegel 1993). As PODs além de reduzirem o H_2O_2 por meio da oxidação de substâncias fenólicas, nitrito, aminas e alguns íons inorgânicos (Regalado et al. 2004), estão relacionadas à organogênese (Lima et al. 2002) e à regulação dos níveis endógenos de auxinas (Pedreño et al. 1990, Gaspar et al. 1994). A POD atua como AIA

oxidase na via de degradação da auxina, principalmente nas fases de crescimento ou formação de órgãos (Andersen 1986). Essa atividade da POD na degradação do AIA favoreceria o aumento da relação BAP/AIA, promovendo a formação de brotações, dando origem às “massas verdes”.

A formação das “massas verdes”, portanto, ocorreu em condições de elevada disponibilidade de BAP, o qual provocou estresse *in vitro* e, conseqüentemente, o incremento de espécies reativas de oxigênio, das atividades da CAT e da POD (reduzidora dos níveis de AIA). A associação desses fatores resultou na excessiva proliferação de brotos, característica das “massas verdes”.

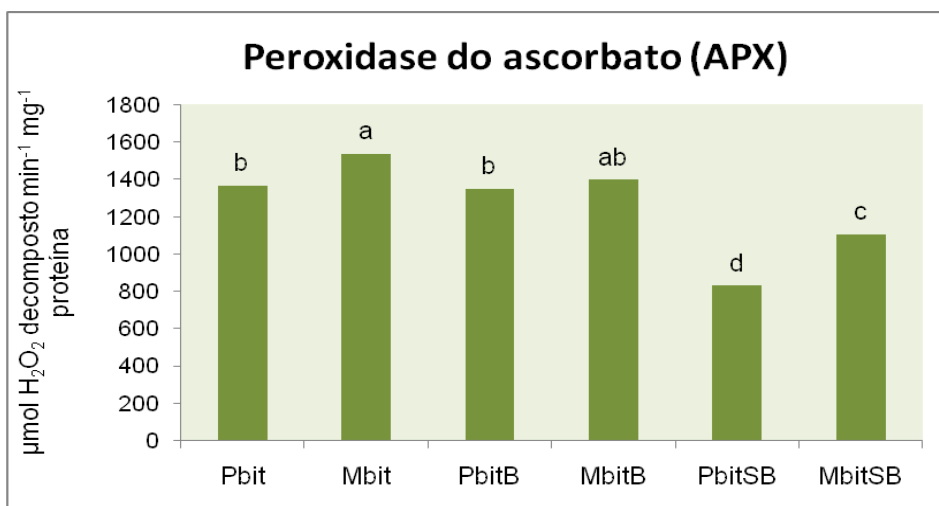
As plantas vindas diretamente do BIT (Pbit) apresentaram a atividade da catalase (Figura 2a), similar ao das plantas que foram subcultivadas no sistema tradicional de cultivo *in vitro* suplementado com o BAP (PbitB). Por outro lado, as plantas subcultivadas no sistema tradicional sem a adição do BAP (PbitSB), apresentaram maior atividade dessa enzima quando comparadas às plantas do BIT (Figura 2a). Quanto à peroxidase (Figura 2b), foi observada uma maior atividade nas plantas subcultivadas no sistema tradicional (PbitB) quando também comparadas às plantas do BIT (Figura 2a).



Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 2. Atividade enzimática na variedade RB872552 de cana-de-açúcar: (a) atividade da catalase; (b) atividade da peroxidase. (Pbit = plantas provenientes do biorreator de imersão temporária; Mbit = massas verdes proveniente do biorreator de imersão temporária; PbitB = plantas provenientes do biorreator, subcultivadas em meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de BAP; MbitB = massas verdes provenientes do biorreator subcultivadas em meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de BAP; PbitSB = plantas provenientes do biorreator subcultivadas em meio MS sem adição de BAP; MbitSB = massas verdes provenientes do biorreator subcultivadas em meio MS sem adição de BAP).

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) mostrou menos variação do que a CAT e a POD. A maior atividade da APX (Figura 3) foi observada nas “massas verdes” quando cultivadas com BAP (Mbit e MbitB). Por outro lado as plantas (PbitSB) e as “massas verdes” (MbitSB) quando subcultivadas sem a adição do regulador de crescimento, apresentaram menor atividade enzimática para a enzima APX (Figura 3). Esse resultado evidencia o efeito que o BAP exerceu na atividade da APX.



Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 3. Atividade enzimática da peroxidase do ascorbato na variedade RB872552 de cana-de-açúcar. (Pbit = plantas provenientes do biorreator de imersão temporária; Mbit = massas verdes proveniente do biorreator de imersão temporária; PbitB = plantas provenientes do biorreator, subcultivadas em meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de BAP; MbitB = massas verdes provenientes do biorreator subcultivadas em meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de BAP; PbitSB = plantas provenientes do biorreator subcultivadas em meio MS sem adição de BAP; MbitSB = massas verdes provenientes do biorreator subcultivadas em meio MS sem adição de BAP).

A ação que o BAP provoca no perfil enzimático é relatada em diversos trabalhos. A atividade da POD foi estimulada pela presença do BAP em *Rosa hybrida* L. (Kapchina-Toteva and Yakimova 1997) e *Manihot esculenta* (Lima et al. 2002). As variedades ‘Dover’ e ‘Burkley de morangueiro (*Fragaria x ananassa*) e de videira (*Vitis vinifera x Vitis rotundifolia*), apresentaram aumento na atividade da CAT (Barbosa 2006), e em *Triticum aestivum* L., além do aumento da CAT, o BAP também estimulou a atividade da APX (Wilson-García et al. 2008).

A maior atividade das enzimas sequestradoras de H₂O₂ (CAT, POD e APX) foi observada nas “massas verdes” cultivadas em BIT, após seis subcultivos sucessivos em meio suplementado com BAP. As atividades das mesmas enzimas apresentaram redução, quando o material vegetal retirado do BIT foi submetido a um subcultivo no sistema tradicional de cultivo *in vitro*. Esses resultados dão indícios de que a desordem fisiológica, que ocasionou a formação das “massas verdes”, seja uma variação temporária provocada pela maior exposição do material vegetal ao regulador de crescimento.

Análise molecular

De acordo com a amplificação dos fragmentos obtidos, observou-se que não houve diferença no padrão de amplificação para nenhum dos *primers* utilizados, a exemplo do UBC 844 (Figura 4). Os iniciadores ISSR permitiram a obtenção de fragmentos monomórficos, sugerindo ausência de variação genética do material vegetal. Dos 42 *primers* utilizados, 25 forneceram produtos de amplificação nítidos. Foi obtido um total de 208 bandas, com uma média de aproximadamente oito bandas por *primer* (Tabela 2).

A reação de PCR-ISSR é uma reação simples, rápida, eficiente e de baixo custo, não requer informação prévia da sequência de DNA do organismo em estudo e é capaz de em uma única reação, reconhecer loci múltiplos no genoma (Zietkiewicz et al. 1994). A eficiência dos marcadores ISSR é reconhecida em várias culturas entre elas destacam-se aveia (Souza et al. 2005), capim andrequicé (Song et al. 2006), cana-de-açúcar (Almeida 2009), plátano (Huang et al. 2009), alfafa (Petolescu and Nedelea 2009), dentre outras.

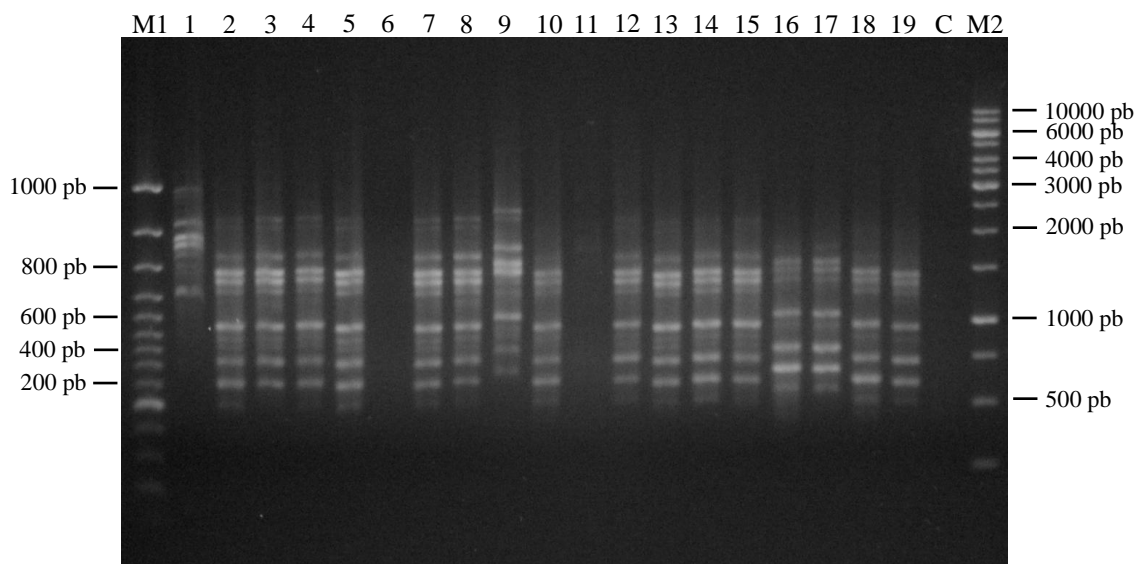


Figura 4. Monomorfismo dos fragmentos amplificados com o *primer* UBC 844. (M1 = DNA ladder, 100pb; 1 a 3 = plantas provenientes do biorreator de imersão temporária; 4 a 6 = massa verde proveniente do biorreator de imersão temporária; 7 a 9 = plantas provenientes do biorreator, subcultivadas em meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de BAP; 10 a 12 = massas verdes provenientes do biorreator subcultivadas em meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de BAP; 13 a 15 = plantas provenientes do biorreator subcultivadas em meio MS sem adição de BAP; 16 a 18 = massas verdes provenientes do biorreator subcultivadas em meio MS sem adição de BAP; 19 = amostra de planta cultivada no campo; C = controle negativo; M2 = DNA ladder 1000pb).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores ISSR utilizados na amplificação do DNA da variedade RB872552 de cana-de-açúcar, incluindo suas temperaturas de anelamento (T_m) e o número total de bandas. Letras significando oligonucleotídeos degenerados: D = (A,G,T); Y= (C, T) e V= (A, C, G).

Olii	Sequências (5' → 3')	T _m (°C)	Nº total de bandas
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	50,4	5
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	52,8	8
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	52,8	5
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50,4	9
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	53,0	5
UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	51,0	11
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	50,4	12
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	52,6	9
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	52,6	14
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	54,8	8
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG YT	52,6	6
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	52,0	11
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	54,0	9
UBC 844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	52,0	11
UBC 845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	54,0	14
UBC 851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	54,8	8
UBC 853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT	52,5	6
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	52,6	7
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	52,6	7
UBC 857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	54,8	12
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	51,9	5
UBC 866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	58,0	6
UBC 884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	52,0	8
UBC 888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	52,0	6
UBC 889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	52,0	6
Total		–	208

A variação morfológica nas plantas de cana-de-açúcar caracterizada pela formação de aglomerado de plantas, denominado de “massa verde”, ocorreu exclusivamente em plantas cultivadas em BIT após sucessivos subcultivos na presença de BAP. A transferência do

material vegetal para o sistema tradicional de cultivo *in vitro*, em meio líquido, sem a adição de BAP, resultou na normalização morfológica das plantas (Figura 5). Esses resultados demonstram que a reversão das “massas verdes” pode ocorrer, quando as mesmas são subcultivadas em meio MS sem adição do BAP. É importante ressaltar que durante o cultivo em BIT, convencionalmente não são realizados sucessivos subcultivos na presença de BAP, sendo este utilizado em apenas um único subcultivo durante (20 dias), seguido de um subcultivo para alongamento (10 dias) e outro para enraizamento (15 dias), os dois últimos sem a presença do BAP na composição do meio de cultivo. Desse modo, é possível supor que a utilização do regulador de crescimento associado aos sucessivos subcultivos em BIT resultou em desordem fisiológica na variedade RB872552 de cana-de-açúcar, provocando a formação das “massas verdes”. Lee et al. (2007) observaram que as “massas verdes”, após a supressão do BAP, recuperaram a morfologia normal das plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*. Outras variações morfológicas temporárias também foram observadas em cana-de-açúcar durante o processo de regeneração de plantas a partir de calos (Lourens and Martin 1987). Fatores como o tempo em que a cultura é mantida, o número de repicagens, a utilização de meios líquidos, altas concentrações de citocinina e trocas gasosas deficientes dentro do frasco podem provocar formação de “massa verde” (Cruz et al. 2009).

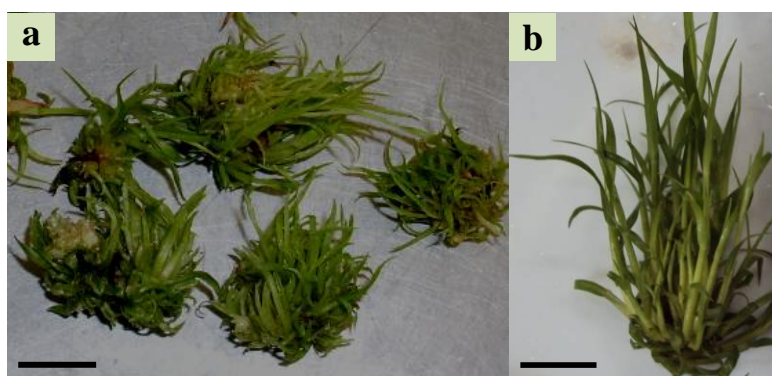


Figura 5. Material vegetal da variedade RB872552 de cana-de-açúcar: (a) “massas verdes” proveniente do cultivo em sistema de biorreator de imersão temporária após seis subcultivos em meio MS suplementado com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP); (b) plantas provenientes da reversão das “massas verdes” subcultivadas em meio MS líquido sem agitação e sem a adição do 6-benzilaminopurina (BAP). Barra: 1cm.

Dosagens excessivas de citocininas ou até mesmo a escolha inadequada da mesma pode ser responsável pelo surgimento de variações morfológicas durante a fase de multiplicação. Assim, apesar de estimular a multiplicação, o excesso de citocininas pode ser tóxico e comprometer o desenvolvimento normal da planta (Fachinello et al. 1994). É reconhecido que a toxidez por citocinina pode provocar brotamento desordenado, falta de alongamento dos caules, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e hiperidricidade generalizada (Leshen et al. 1988). Variações dessa natureza foram relatadas em diversas culturas, como *Daucus carota* (Skirvin 1978), *Dioscorea alata* L. (Rodríguez et al. 1999), *Musa* spp (Santos e Rodrigues 2004, Shirani et al. 2009), *Dyckia maritima* (Silva et al. 2008), *Kielmeyra coriaceae* (Pinto et al. 1994), entre outras.

As alterações morfológicas observadas podem ser decorrentes de variações genéticas e epigenéticas que ocorrem na cultura de tecidos, as quais podem ser provocadas pela interação de diversos fatores e especula-se que o estresse oxidativo seja responsável, pelo menos em parte, por essas desordens fisiológicas (Cassels and Curry 2001). Dessa forma, é provável que haja uma relação entre o aumento das atividades enzimáticas, devido ao estresse ao qual esse material foi submetido, e o aparecimento de plantas morfológicamente anormais na variedade de cana-de-açúcar RB872552. Por outro lado, a homogeneidade no padrão fingerprinting em todas as amostras amplificadas, considerando o número de *primers* ISSR utilizados, indica a ausência de mudanças no genoma.

Apesar dos reguladores de crescimento serem essenciais no desenvolvimento das culturas *in vitro*, e os subcultivos aumentarem a produção de plantas, os mesmos podem provocar situações indesejáveis, como as observadas nesta pesquisa. Portanto, é importante que tanto os subcultivos quanto os reguladores de crescimento sejam utilizados de forma controlada, para que possam contribuir positivamente para a cultura de tecidos de plantas. Por outro lado, é importante considerar a possibilidade de reversão das alterações morfológicas,

sobretudo, em sistemas de produção em larga escala como nos biorreatores de imersão temporária.

CONCLUSÃO

- ❑ A catalase e a peroxidase foram as enzimas que mostraram maior nível de estresse da variedade RB872552 quando cultivada em sistema de biorreator de imersão temporária;
- ❑ A análise ISSR confirmou fidelidade genética nas amostras da variedade RB872552 de cana-de-açúcar;
- ❑ É sugerida a utilização de cinco subcultivos para que não ocorra a formação de “massa verde” na variedade RB872552;
- ❑ A situação de estresse ao qual esteve submetido o material vegetal foi capaz de provocar desordem fisiológica e alterações morfológicas de origem epigenética.

REFERÊNCIAS

- Almeida CMA, Lima SEM, Lima GSA, Brito JZ, Donato VMTS and Silva MV (2009) Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia** 33:1771-1776.
- Andersen WCA (1986) A revised medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal American Society Horticultural Science** 109:343-347.
- Assis E and Silva FAZ (2008) **Assistat 7.5 beta**. DEAG-CTRN-UFCG, Campina Grande.
- Barbosa LMP (2006) **Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricidade em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) propagados *in vitro***. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa.
- Berris LSJR and Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry** 195(1):133-140.
- Bornet B and Branchard M (2001) Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter** 19:209-215.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254.
- Cassells AC and Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 64:145-157.
- Conab (2010) Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2010. Conab.
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/ecf76fd96889c63b1368be8085214377..pdf> Acesso 22 Novemb 2010.

Cruz MAL, Silva ADC, Veiga CFM and Silveira V (2009) **Biofábricas para produção de mudas por micropropagação: estratégia para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar no Rio de Janeiro**. InterSciencePlace.

<http://www.interscienceplace.org/interscienceplace/article/view/50/55>. Acesso 20 Novemb 2010.

Dantas ACM, Fortes GRL, Nezi NA and Silva JB (2000) Variabilidade fenotípica de somaclones do porta-enxerto de macieira m.111, na multiplicação e enraizamento *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência** 6(2):91-94.

Dat J, Vandenberghe S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D and Breusegem FV (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences** 57:770-795.

Desikan R, Mackerness SAH, Hancock TJ and Neill SJ (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology** 127:159-172.

Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12:13-15

Fachinello JC, Hoffmann A, Nachtigal JC, Kersten E and Fortes GRL (1994) **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Editora e Gráfica Universitária da UFPel, Pelotas.

Fatibelho-Filho O and Vieira IC (2002) Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova** 25(3):455-464.

Gaspar T, Kevers C, Hausman JF and Ripetti V (1994) Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In: Lumdsen PJ, Nicholas JR and Daveis WJ **Physiology, growth and development of plants in culture**. Kluwer Acad Pub Dordrecht, pp 289-298.

George EF (1993) **Plant propagation by tissue culture**. The Technology Exegetics, London.

- Gupta M, Chyi Y-S, Romero-Severson J and Owen JL (1994) Amplification of DNA from evolutionarily diverse use single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical Applied Genetics** 89:998-1006.
- Gupta PK and Varshney RK (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica** 113:163-185.
- Huang WJ, Ning GG, Liu GF and Bao MZ (2009) Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers. **Biologia Plantarum** 53(1):159-63.
- Kaeppler SM, Kaeppler HF and Hee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology** 43:179-188.
- Kapchina-Toteva V and Yakimova E (1997) Effect of purine and phenylurea cytokinins on peroxidase activity in relation to apical dominance of *in vitro* cultivated rosa hybrida L. **Plant Physiology** 23(1-2):40-48.
- Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommes J and Gaspar T (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 77:18-91.
- Larkin PJ and Scowcroft WR (1981) Somaclonal variations – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics** 60:547-554.
- Lee, TSG, Bressan, EA, Silva AD and Lee LL (2007) Implantação de biofábricas de cana-de-açúcar: riscos e sucessos **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 13:2032-2040.
- Leshen B, Werker E and Shalev DP (1988) The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany** 62:271-276.

Lima GPP, Barsalobres C, Piza IMT and Cereda MP (2002) Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv Mcol 22) cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira Agrociência** 8(2):107-110.

Lindsey K and Jones MGK (1992) **Biotecnologia vegetal agrícola**. Acribia, Zaragoza.

Lourens AG and Martin FA (1987) Evaluation on *in vitro* propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation. **Crop Science** 27:793-796.

Mehrotra S, Goel MK, Kukreja AK and Mishra BN (2007) Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: a progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology** 6(13):1484-1492.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15:473-497.

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

Oliveira ACB, Caixeta ET, Zambolim EM, Zambolim L and Sakiyama NS (2007) **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Instituto Agonômico, Campinas.

Oliveira JEZ, Amaral CLF and Casali VWD (2008) Caracterização isozimática e atividade de peroxidase em folhas de plantas hiperídrica, intermediária e normal de *Bidens pilosa* L. mantidas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia** 32(1):32-36.

Pedreño MA, Ros Barceló A, Garcia-Carmona F and Muñoz R (1990) Oxidation of dihydroxyfumaric acid in the absence of H₂O₂ by cell wall-bound peroxidases from lupin: A possible general model. **Plant Physiology and Biochemistry** 28:37-42.

Petolescu C and Nedelea G (2009) Genetic diversity analysis of the *in vitro* regenerated alfalfa plants using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Rom Biotechnol Lett** 14(6):4882-4886.

Pinto JEBP, Arellano EF, Pinto CABP and Barbosa MHP (1994) Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de *Kielmeyra coriacea*.

Pesquisa Agropecuária Brasileira 29(6):867-873.

Piza IMT (2000) **Bromelina e peroxidase em plantas de *Ananas comosus* L. Merrill, sob condições de salinidade *in vitro***. Tese, Universidade Estadual Paulista.

Prasad MNV (2004) Radicales libres (FR¹) Y species reactivas del oxígeno (ROS²). In: Reigosa MJ, Pedrol N, Sánchez A. **La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis**. Thompson, Madrid, p 775-790.

Regalado C, Garcia-Almendarez BE and Duarte-Vazquez MA (2004) Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Review** 3:243-256.

Rodríguez SM, Corría MG and Abeal EE (1999) **Modificaciones morfofisiológicas en vitroplantas de ñame (*Dioscorea alata* L.)**. Universidade de Granma - Ciap. Disponível em: [http://biblioteca.idict.villaclara.cu/UserFiles/File/ciencia/1\(6\).pdf](http://biblioteca.idict.villaclara.cu/UserFiles/File/ciencia/1(6).pdf). Acesso 20 Novemb 2010.

Saher S, Piqueras A, Hellin E and Olmos E (2004) Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiology Plantarum** 120(1):152-161.

Sandal I, Bhattacharya A and Ahuja OS (2001) An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 65:75-80.

Santos CCC and Rodrigues PHV (2004) Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar pacovan. **Bragantia** 63(2):201-205.

Shirani S, Mahdavi F and Maziah M (2009) Morphological abnormality among regenerated shoots of banana and plantain (*Musa* spp.) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot-tips. **African Journal of Biotechnology** 8(21):5755-5761.

Siegel BJ (1993) Plant peroxidases - an organismic perspective. **Plant Growth Regulation** 12:303-312.

- Silva ALL, Franco ETH, Dornelles EB and Gesing JPA (2008) Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Iheringia** 63(1):135-138.
- Silvarolla MB (1992) Plant genomic alterations due to tissue culture. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science** 44:329-335.
- Skirvin RM (1978) Natural and induced variation in tissue culture. **Euphytica** (27):241-266.
- Song Z, Guan Y, Rong J, Xu X and Lu B. (2006) Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in populations of the cutgrass *Leersia hexandra*. **Aquatic Botany** 84:359-362.
- Souza VQ, Pereira AS, Silva A, Kopp M M, Coimbra JLM, Carvalho FIF, Luz VK and Oliveira AC (2005) Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia** 64(4):569-575.
- Staub JE, Serquen FC and Gupta M (1996) Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience** 31(5):729-741.
- Teisson C and Alvard D (1994) **A new concept of plant *in vitro* cultivation in liquid medium: temporary immersion**. In: International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, 7, Florença. Abstract..., 54p.
- Wilson-García CY, Zavaleta-Mancera HA, López-Delgado H and Hernández-Garay A (2008) La citocinina BAP retrasa senescencia, aumenta antioxidantes, proteína y crecimiento en el pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.). **Agrociencia** 42(7):799-806.
- Zeraik AE, Souza FS, Fatibelho-Filho O and Leite OD (2008) Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova** 31:731-734.
- Zietkiewicz E, Rafalski A and Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20:176-183.
- Ziv M (1995) The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae** 393(1):25-38.

Zucchi MI, Arizono H, Morais VA, Fungaro MHP and Vieira MLC (2002) Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. **Genetics and Molecular Biology** 25(1):91-96.

ANEXO

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO NA REVISTA CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY

Versão em português

CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY

Política geral e escopo da revista

A CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY (ISSN 1518-7853, versão impressa, ISSN 1984-7033, versão on line) - é a revista trimestral oficial da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas (www.sbmp.org.br). Seu nome internacional abreviado é CROP BREED APPL BIOTECH.

A revista está indexada no SciELO Brasil, ISI Thomson Reuters, Scopus, AGRIS, CAB International Abstracts, Biosys, Latindex, Periódica, Chemical Abstracts Service, Agricola, Agrobase, Wilson, Ebsco, DOAJ, Acervo Documental da Embrapa e Portal da Capes, e destina-se à publicação de artigos científicos originais, exclusivamente em inglês, que possam contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico do melhoramento e da agricultura. Os artigos deverão contemplar as pesquisas básica e aplicada em melhoramento de plantas perenes e anuais, nas áreas de genética, conservação de germoplasma, biotecnologia, genômica, citogenética, estatística experimental, sementes, qualidade de alimentos, estresse biótico e abiótico, e áreas correlatas. A CBAB publica ainda, além de artigos, outras modalidades de trabalhos, como Revisões, Notas, Programas de melhoramento, Lançamento de cultivares, Resenha de livro, Pontos de vista e Cartas, todos submetidos ao crivo de revisores *ad hoc*.

SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Versão em português

CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY

Instruções aos Autores

Política geral e escopo da revista

A **CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY** (ISSN 1518-7853, versão impressa, ISSN 1984-7033, versão on line) - é a revista trimestral oficial da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas (<http://www.sbmp.org.br>). O nome internacional abreviado é CROP BREED APPL BIOTECHNOL. A revista está indexada na ISI Thomson Reuters, Scopus, AGRIS, CAB International Abstracts, Biosys, Latindex, Periódica, Chemical Abstracts Service, Agricola, Agrobase, Wilson, Ebsco, DOAJ, Acervo Documental da Embrapa and Portal da Capes e destina-se à publicação de artigos científicos originais que possam contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico do melhoramento e da agricultura. Os artigos deverão contemplar as pesquisas básica e aplicada em melhoramento de plantas perenes e anuais, nas áreas de genética, conservação de germoplasma, biotecnologia, genômica, citogenética, estatística experimental, sementes, qualidade de alimentos, estresse biótico e abiótico, e áreas correlatas. O artigo deve ser inédito, sendo vetada a submissão do mesmo a outro periódico. As opiniões e conceitos emitidos são de exclusiva responsabilidade dos autores, não refletindo necessariamente as idéias da Editoria. A Editoria, porém se reserva o direito de sugerir ou solicitar as modificações que se fizerem necessárias. A reprodução completa ou parcial dos artigos é permitida, desde que citada a fonte.

Informação para aquisição

Para associar-se à Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas ou adquirir exemplares avulsos da CBAB envie e-mail para **cbab@ufv.br**.

Artigo

A **CBAB** publica artigo exclusivamente em inglês, porém faculta ao autor a possibilidade de submetê-lo em português para, após o aceite, providenciar a sua tradução. O ônus da tradução é de responsabilidade do autor, porém a **CBAB** recomenda que ela seja feita por seu tradutor oficial. Contribuições são submetidas via WEB acessando <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/index.php>, clicando **Submission**. O sistema de gerenciamento de artigos solicitará o e-mail do autor correspondente e a geração de uma senha. **Os manuscritos deverão ser inseridos sem os nomes dos autores e seus endereços, os quais deverão ser disponibilizados em um formulário à parte.** Como a CBAB opera

com revisão do tipo duplo cego, autores não devem revelar suas identidades no manuscrito. Com seu e-mail e sua senha pessoal, o autor poderá acompanhar toda a tramitação do seu artigo. A avaliação do artigo será feita por revisores *ad hoc* especialistas, para auxiliar a Editoria quanto à decisão final de aceite, modificações ou rejeição do mesmo.

O artigo completo deverá conter, preferencialmente, a seguinte sequência: title, abstract, key words, introduction, material and methods, results and discussion, acknowledgements, título, resumo, palavras-chave, references, and tables and black-and-white figures. Ilustrações coloridas serão permitidas, porém com ônus para o autor correspondente. A digitação deverá ser feita em Word for Windows versão 6.0 em diante, em fonte times new roman, tamanho 12, espaçamento duplo, formato A4, com margens de 20 mm e paginação consecutiva no topo à direita. O artigo não deverá exceder a 18 páginas, incluindo tabelas e figuras digitadas em páginas separadas (uma por página) ao final do texto. O Título deverá ser claro, conciso e refletir a essência do artigo. Escrito com a inicial maiúscula e posto a esquerda, não deve conter mais de 15 palavras digitadas em times new roman 14, negrito. O Abstract, tanto quanto o Resumo, não deve exceder a 150 palavras. Um máximo de cinco palavras-chave, diferentes do título, será permitido. A introdução deve incluir uma breve revisão de literatura sobre o tema e os objetivos da pesquisa. O Material e Método deve ser redigido de modo que outro pesquisador possa repetir a experiência. Preferencialmente, Resultados e Discussão devem ser apresentados em conjunto, para maior dinâmica de leitura. Os agradecimentos devem ser sucintos, limitados a colaboradores efetivos e agências financiadoras. O Resumo deve ser precedido do título do artigo em português.

Cuidado com as Referências. Não citar resumos de eventos, teses e nem artigos não publicados. Esses cuidados darão maior credibilidade ao artigo e a revista. As citações feitas no texto pelo sobrenome do autor e ano (por exemplo, Liu 1998, Pereira and Amaral Júnior 2001, William et al. 1990) deverão ser ordenadas alfabeticamente no item Referências, seguindo os exemplos abaixo:

Artigos em periódicos:

Pereira MG and Amaral Júnior AT (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 1: 3-10.

Livro:

Ramalho MAP, Ferreira DF and Oliveira AC (2000) **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Editora UFLA, Lavras, 326p.

Capítulo de livro:

Sakiyama NS, Pereira AA and Zambolim L (1999) Melhoramento do café arábica. In: Borém A (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Editora UFV, Viçosa, p. 189-204.

Congresso:

Frey KJ (1992) Plant breeding perspectives for the 1990s. In: Stalker HT and Murphy JP

(eds.) **Proceedings of the Symposium on Plant Breeding in the 1990s**. CAB, Wallingford, p. 1-13.

A **CBAB** publica ainda outras modalidades de trabalhos, todos submetidos ao crivo de revisores *ad hoc*, do mesmo modo que os artigos.

Revisões

As Revisões, também limitadas a 18 páginas digitadas, serão solicitadas pela Editoria a(os) autor(es) consolidados nas pesquisas que envolvem o tema da revisão. Elas serão elaboradas com o objetivo de lançar luz a um tema instigante que mereça uma análise aprofundada sobre o seu estado-da-arte.

Notas

As Notas são limitadas a 12 páginas digitadas e destinadas a informar pesquisas ou observações novas, para as quais as ferramentas analíticas não se aplicam. Elas podem focar tema de amplo interesse; relato curto de uma pesquisa original; relato de pesquisa participativa; observações de especial interesse nas áreas de pesquisa, ensino, extensão; lançamento de um novo software relacionado com a área de melhoramento.

Programas de melhoramento

Programas de melhoramento inovadores ou que se destaquem pela eficiência, impacto e/ou continuidade poderão ser retratados na **CBAB**, limitados a 18 páginas digitadas.

Lançamento de cultivares

Os novos cultivares merecerão uma seção especial pela importância que representam para o melhoramento e, por conseguinte, para a agricultura nacional. A seção Lançamento de novos cultivares deverá conter abstract, limitado a 50 palavras, palavras chaves, introdução, métodos de melhoramento utilizados, características de desempenho, produção de sementes básicas e um mínimo de referências, tabelas e figuras. Todo o texto ficará limitado a 12 páginas digitadas.

Resenha de livro

Esta nova seção foi criada para anunciar novos livros relacionados ao melhoramento de plantas. A contribuição para essa seção se dará mediante envio, pelo autor, de dois exemplares da obra. O livro será encaminhado para um revisor especializado, escolhido pela Editoria, para elaborar a resenha.

Pontos de vista

Pontos de vista, assim como as revisões, serão elaborados para a **CBAB** a convite da Editoria, para retratar temas de interesse dos melhoristas e da sociedade.

Cartas

Cartas breves, também de interesse geral, serão aceitas para publicação. A Editoria se reserva o direito de editar as cartas por limitações de espaço e clareza de exposição.

Autores de artigos na **CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY** terão como benefícios:

- Submissão e revisão de artigos eletronicamente
- Rápida publicação: tempo médio de 6 meses, em 2008
- Artigos disponibilizados em pdf na WEB

Envie artigos acessando <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/index.php> clicando em **Submission**

CBAB - Crop Breeding and Applied Biotechnology
Departamento de Fitotecnia
Universidade Federal de Viçosa
Campus Universitário
S/N36570-000 Viçosa - MG - Brasil
+55 31 3899-2611 - cbab@ufv.br