

MARINA MEDEIROS DE ARAÚJO SILVA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA E INDIRETA EM CANA-DE-AÇÚCAR:
BUSCA DE CORRELAÇÕES COM O ESTRESSE *IN VITRO*

RECIFE
FEVEREIRO/2010

MARINA MEDEIROS DE ARAÚJO SILVA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA E INDIRETA EM CANA-DE-AÇÚCAR:
BUSCA DE CORRELAÇÕES COM O ESTRESSE *IN VITRO*

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

Orientação

DSc. Terezinha Rangel Camara – Orientadora

Professora, Departamento de Química – UFRPE

DSc. Cláudia Ulisses – Co-orientadora

Professora, Departamento de Agronomia – UFRPE/UAG

RECIFE
FEVEREIRO/2010

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA E INDIRETA EM CANA-DE-AÇÚCAR:
BUSCA DE CORRELAÇÕES COM O ESTRESSE *IN VITRO*

MARINA MEDEIROS DE ARAÚJO SILVA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____/____/____

ORIENTADORA:

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

EXAMINADORES:

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

DSc. Reginaldo de Carvalho
Professor do Departamento de Biologia – UFRPE

DSc. Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Pesquisadora da Embrapa Algodão – CNPA

*Aos meus familiares e amigos,
pelo apoio e por acreditarem em mim,
Dedico.*

*À minha mãe, Judith,
pelo amor, dedicação e por
mais uma etapa vencida,
Ofereço.*

*“Se você consegue sonhar algo,
consegue realizá-lo.”
(Walt Disney)*

Agradecimentos

A Deus, força maior que rege a natureza, que me inspira a cada dia, me fortalece e me guia, para que possa enfrentar as adversidades e continuar a caminhar com passos firmes.

A minha família, em especial a minha mãe Judith, meus irmãos Marilian e Renan e a minha avó Marietta, pelo amor, incentivo, compreensão e apoio permanente.

A Jaislanny, Silvany e Romero, por tudo que dividimos e vivemos juntos na Creuzo's house. Pela presença constante e indispensável, pela cumplicidade e amizade sincera. Tenho certeza que continuaremos sempre torcendo e apoiando uns aos outros. Mais que amigos, somos também uma família!

Aos meus amigos Pollyana, Michelle, Wedson, Jane, Manuella, Cínthya e Lanúzia, pelo carinho, estímulo e os bons momentos compartilhados.

A minha orientadora Profa. Terezinha Camara, pela oportunidade, confiança, competência, incentivo, amizade e pelos valiosos ensinamentos.

As professoras Lilia Willadino e Cláudia Ulisses, pela amizade, carinho, gentileza e pelos conhecimentos transmitidos.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, sobretudo aos que compõem o Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas, pela assistência e colaboração nos serviços prestados.

A todos os amigos do mestrado, em especial, Eva, João, Jacque, Bel, Rômulo, Kaliny, Uiara, Morganna, Paulo e Geórgia, pelo companheirismo, momentos inesquecíveis e acima de todos os aperreiros, muita alegria!

A todos que compõem o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais: Well, Luciana, Maninho, Vitor e Manu, pelo carinho com que fui recebida, pela divertida convivência, ajuda, amizade e muitos sorrisos... sentirei muita falta de vocês!

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, de próximo ou de longe incentivaram e colaboraram com a realização deste sonho, todo o meu carinho e gratidão,

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ES - Embriogênese Somática
ESD - Embriogênese Somática Direta
ESI - Embriogênese Somática Indireta
EE - Explante Embriogênico
NE - Explante Não Embriogênico
IFE - Índice de Formação de Embriões
IFC - Índice de Formação de Calos
 E_{emb} - Eficiência da Embriogênese Somática
2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
BAP - 6-benzilaminopurina
ANA - Ácido naftalenoacético
KIN - Cinetina
BIT - Bioreator de Imersão Temporária
SIT - Sistema de Imersão Temporária
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
POD - Peroxidase
PPO - Polifenoloxidase
CAT - Catalase
SOD - Superóxidodismutase
APX - Peroxidase do ascorbato
 H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio
 $O_2^{\bullet-}$ - Superóxido
 HO^{\bullet} - Radical hidroxila

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Representação esquemática das possíveis etapas do processo morfogênico *in vitro*..... 20

Figura 2. Esquema dos estágios da embriogênese em *Liliopsida*..... 23

CAPÍTULO II - EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA NA VARIEDADE RB 872552 DE CANA-DE-AÇÚCAR E SUA CORRELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO

Figura 1. Embriogênese somática direta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar. Embriões formados a partir de segmentos basais de folhas jovens não expandidas aos 40 dias de cultivo: (A) tratamento TG segundo metodologia de Geetha & Padmanabhan (2001); (B) tratamento TA segundo metodologia de Ali et al., (2007)..... 48

Figura 2. Embriogênese somática direta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar: (A) início da diferenciação de embriões em plantas após 20 dias em meio de conversão: eg = embrião somático globular, pf = primórdio foliar, rz = raiz; (B) fase inicial de desenvolvimento de uma planta a partir de embrião somático após 30 dias em meio de conversão; (C) plantas regeneradas *in vitro* após 60 dias de supressão do 2,4-D e do BAP do meio MS; (D) planta regenerada apresentando variegação, possivelmente decorrente de variação somaclonal..... 52

Figura 3. Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB872552 após 30 dias de cultivo em biorreatores de imersão temporária (BIT). As plantas são provenientes de embriões somáticos formados por via direta em meio MS com 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,25 mg.L⁻¹ de BAP e convertidos em meio MS sem reguladores de crescimento..... 53

Figura 4. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar, após 40 dias de indução da ESD; (A) explante com aspecto embriogênico; (B) explante com aspecto não embriogênico; (C) atividade da PPO em explantes embriogênicos (EE) e não embriogênicos (NE); (D) atividade da POD em EE e NE; (E) atividade da CAT em EE e NE..... 55

Figura 5. Cortes histológicos de explantes embriogênicos de cana-de-açúcar da variedade RB 872552 cultivados em meio MS acrescido de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP durante 40 dias; (A) início da formação de embriões somáticos (setas); (B) embrião somático em estágio globular, com células pequenas e núcleos proeminentes: eg= embrião globular, sp= suspensor (Barra=1mm)..... 58

Figura 6. Embriogênese somática indireta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar: (A) calo embriogênico formado a partir de explante inoculado em meio MS com 8 mg.L^{-1} de 2,4-D e 10 mL.L^{-1} de Fe-EDTA (tratamento D8F10) após 8 semanas; (B) plantas regeneradas após 60 dias em meio de conversão..... 61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA NA VARIEDADE RB 872552 DE CANA-DE-AÇÚCAR E SUA CORRELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO

Tabela 1- Descrição dos tratamentos de indução de embriogênese somática direta em cana-de-açúcar de acordo com metodologias descritas por Snyman et al. (2006), Desai et al. (2004), Geetha & Padmanabhan (2001) e Ali et al. (2007).....	44
Tabela 2- Índice de formação de embriões somáticos (IFE) em segmentos basais de folhas jovens não expandidas da variedade RB 872552 de cana-de-açúcar, após 40 dias de incubação em distintos meios indução de embriogênese somática direta (ESD).....	49
Tabela 3- Índice de formação de calos (IFC) em segmentos basais de folhas jovens não expandidas da variedade RB 872552 de cana-de-açúcar, após 4 semanas de incubação em distintos meios indução de embriogênese somática indireta (ESI).....	59

SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
CAPÍTULO I.....	13
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Cana-de-açúcar: aspectos gerais.....	16
2.2. Cultura de tecidos.....	17
2.3. Morfogênese <i>in vitro</i>	19
2.4. Embriogênese somática.....	21
2.5. Estresse oxidativo: espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidativas..	24
2.6. Atividade do peróxido de hidrogênio e enzimas antioxidativas durante a embriogênese somática.....	26
3. REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO II.....	39
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA NA VARIEDADE RB 872552 DE CANA-DE- AÇÚCAR E SUA CORRELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO.....	40
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
AGRADECIMENTOS.....	62
REFERÊNCIAS.....	62
CONCLUSÕES GERAIS.....	69
ANEXO.....	71
INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA SCIENTIA AGRICOLA.....	72

RESUMO

A embriogênese somática é uma técnica de cultivo *in vitro* aplicada na propagação clonal de plantas e na regeneração de células transformadas geneticamente, além de auxiliar estudos básicos relacionados aos eventos morfológicos, moleculares e bioquímicos que ocorrem durante o processo embriogênico. As fases iniciais dessa via morfogênica são caracterizadas pela indução de genes relacionados ao estresse, o que leva à hipótese de que a embriogênese somática é uma resposta extrema ao estresse de células de plantas cultivadas *in vitro*. Neste trabalho, foram induzidas as vias embriogênicas direta e indireta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar e analisada a atividade de enzimas do sistema antioxidante, a fim de avaliar a correlação entre a embriogênese somática e a regulação do estresse oxidativo. Para a via direta (ESD), foram aplicados quatro tratamentos (TS, TD, TG e TA) baseados em protocolos já descritos para cana-de-açúcar. Esses protocolos diferiam quanto à composição do meio e condição de incubação (escuro ou fotoperíodo de 16 horas), em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. Para a via indireta (ESI), foram utilizados oito tratamentos diferenciados pelas combinações de quatro concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e duas de Fe-EDTA, em esquema fatorial 4x2 e 20 repetições por tratamento. Foram calculados os índices de formação de embriões (IFE) e de calo (IFC) e avaliada a atividade da catalase, peroxidase e polifenoloxidase. Embriões somáticos foram visualizados apenas nos tratamentos de ESD acrescidos de 2,4-D e BAP (6-benzilaminopurina), e no tratamento de ESI com 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D. A conversão de embriões somáticos em plantas foi realizada em meio de cultura sem adição de fitoreguladores. A atividade das enzimas antioxidantes foi obtida através de leitura feita em espectrofotômetro, a partir do extrato obtido de tecidos embriogênicos e não embriogênicos dos tratamentos de ESD. A atividade da polifenoloxidase e da catalase aumentou em tecidos não embriogênicos, enquanto que a peroxidase foi menos ativa nesses tecidos quando comparada aos embriogênicos. Evidenciou-se que a indução da embriogênese somática na variedade estudada está relacionada ao estresse oxidativo e que estas enzimas antioxidantes podem exercer papel relevante como marcadores bioquímicos deste processo.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum* L., micropropagação, calogênese, enzimas antioxidantes, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), embriões somáticos, histologia.

ABSTRACT

The somatic embryogenesis is a technique of *in vitro* culture applied in clonal propagation of plants and regeneration of genetically transformed cells, in addition to supporting basic studies related to morphological, molecular and biochemical events that happen during the embryogenic process. The initial stages of this morphogenic pathway are characterized by the induction of genes related to stress, which leads to the hypothesis that somatic embryogenesis is an extreme response to stress in plant cells cultivated *in vitro*. In this work, were induced embryogenic pathways direct and indirect in the RB 872552 variety of sugarcane and analyzed the activity of enzymes from antioxidant system in order to assess the correlation between somatic embryogenesis and regulation of oxidative stress. For the direct pathway (ESD), were applied four treatments (TS, TD, TG e TA) based on protocols previously described for sugarcane. These protocols differed as to the composition of the medium and incubation condition (dark or light period of 16 hours) in a completely randomized design with 10 replications per treatment. For the indirect pathway (ESI), were used by eight different treatments combinations of four concentrations of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and two Fe-EDTA, in a factorial 4x2 and 20 replicates per treatment. Were calculated the indices of embryo formation (IFE) and callus (IFC) and evaluated the activity of catalase, peroxidase and polyphenoloxidase. Somatic embryos were visualized only in the treatment of ESD plus 2,4-D and BAP (6-benzylaminopurine), and treatment of ESI with 8 mg.L⁻¹ 2,4-D. The conversion of somatic embryos into plants was performed in culture medium without added phytohormones. The activity of antioxidant enzymes was obtained by reading of a spectrophotometer, from the extract obtained from embryogenic and non-embryogenic tissues treatment of ESD. The polyphenoloxidase and catalase activity increased in non-embryogenic tissue, whereas peroxidase was less active in these tissues when compared to embryogenic. It was found that the induction of somatic embryogenesis in the variety studied is related to oxidative stress and that these antioxidant enzymes may become important as biochemical markers of this process.

Key words: *Saccharum officinarum* L., micropropagation, callogenesis, antioxidants enzymes, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), somatic embryos, histology.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1. Introdução Geral

O cultivo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) estende-se a regiões tropicais e subtropicais de mais de 80 países, sendo o Brasil seu maior produtor. Dessa forma, o agronegócio assume papel relevante no cenário socioeconômico nacional e mundial, fornecendo matéria-prima para as agroindústrias do açúcar, álcool e aguardente, além de representar uma importante fonte de geração de empregos e renda no setor industrial e rural (CESNIK e MIOCQUE, 2004).

A cana-de-açúcar está freqüentemente inserida em programas de melhoramento genético, visando à introdução de características de interesse agrônômico, como resistência a pragas e patógenos, tolerância a herbicidas e aumento no teor de sacarose. Dada à expressão econômica da cultura e das novas vocações que estão emergindo para essa atividade, os trabalhos de melhoramento genético por meio da biotecnologia têm recebido interesse crescente (SNYMAN et al., 2006). Além disso, a partir do lançamento de novas variedades, a disponibilização em larga escala do material melhorado é uma etapa crucial para a implantação de cultivos com os genótipos elite, sendo a micropropagação uma alternativa ao processo convencional de propagação vegetativa, por promover altas taxas de multiplicação em curto espaço físico e temporal (GEIJSKES et al., 2001; SOUZA et al., 2006).

Diversas metodologias de cultivo *in vitro* de plantas podem ser adotadas para a propagação massiva de material selecionado; dentre elas, destaca-se a embriogênese somática (ES), caso particular de morfogênese, no qual células somáticas cultivadas *in vitro* são induzidas a formar embriões, sem que ocorra a fusão de gametas (HANDRO e FLOH, 1990). Além da multiplicação de genótipos superiores, esta técnica constitui também uma ferramenta bastante útil para estudos básicos de processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos dos sistemas vegetais, além de permitir a regeneração de plantas geneticamente transformadas.

De acordo com Guerra et al. (1998), embriões somáticos podem ser obtidos segundo dois padrões de desenvolvimento: um modelo direto, onde os embriões se originam dos tecidos matrizes sem a formação de estágio intermediário de calo e um modelo indireto, onde há formação de um tecido intermediário, o qual apresenta células em diversos estádios de diferenciação e, conseqüentemente com diferentes

graus de determinação, que podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos.

As fases iniciais da ES são caracterizadas pela indução de muitos genes relacionados ao estresse, o que leva à suposição de que esta via morfogênica é uma resposta extrema ao estresse de células cultivadas *in vitro*. Uma das hipóteses sobre o mecanismo envolvido na indução da ES destaca a importância da interação entre auxinas e a sinalização do estresse, que resulta na aquisição da competência embriogênica da célula somática por meio da reprogramação celular (FEHÉR et al. 2003).

Alguns autores têm correlacionado o aumento da atividade de enzimas antioxidativas com a resposta embriogênica dos tecidos somáticos, sugerindo que o estresse oxidativo contribui para acelerar o processo de ES (GAJ, 2004; NIEVES et al., 2003; BLAZQUEZ et al., 2009). No entanto, ainda são escassos os conhecimentos acerca dos eventos bioquímicos que ocorrem quando essas células se tornam competentes para produzir embriões, sendo necessário estudos adicionais para a determinação desses padrões durante o desenvolvimento embrionário, a fim de poder fornecer subsídios para a otimização dos sistemas de propagação *in vitro* baseados nesta técnica.

A regeneração de plantas de cana-de-açúcar a partir da ES iniciou-se com os estudos de Ho e Vasil (1983) e vem sendo descrita com diferentes explantes e para um grande número de variedades (MANICKAVASAGAM e GANAPATHI, 1998; GILL et al., 2004; LAKSHMANAN, 2006; HEERDT, 2008). Contudo, a resposta morfogenética dos tecidos está sob influência hormonal e é genótipo-dependente (TAYLOR, 1994), tornando necessário seu estudo em outras variedades.

O presente trabalho objetivou induzir a embriogênese somática direta e indireta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar e avaliar as possíveis correlações entre a eficiência embriogênica e a resposta ao estresse oxidativo, mediada pela atividade de enzimas do sistema antioxidativo.

2. Revisão de Literatura

2.1. *Cana-de-açúcar: aspectos gerais*

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), planta alógama, de ciclo perene, pertencente à classe Liliopsida (Monocotyledoneae) e a família Poaceae, destaca-se como a maior cultura industrial do mundo, sendo amplamente cultivada em países tropicais e subtropicais para a produção de açúcar, além de servir como matéria-prima para processos industriais de produção de álcool etílico, ácido acético, butanol, papel, “madeira” compensada, enzimas industriais e alimento animal (ARENCEBIA, 1998; CESNIK e MIOCQUE, 2004; CIDADE et al., 2006).

A agroindústria canavieira é destaque no cenário agrícola nacional, sendo o Brasil o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com mais de 571 milhões de toneladas na safra 2008/2009 (CONAB, 2009). O Brasil aparece também como maior exportador de açúcar e álcool e como o único país que domina todos os estágios tecnológicos da cadeia produtiva desta cultura. O setor sucroalcooleiro do Brasil é o mais competitivo do mundo, possuindo os maiores níveis de produtividade e rendimento industrial associados aos menores custos de produção (UNICA, 2007; LEMOS, 2009).

O agronegócio da cana-de-açúcar agrega elos geradores de várias atividades: produção da cultura, processamento de açúcar, álcool e produtos derivados de subprodutos, bem como serviços de pesquisa, capacitação, assistências técnica e creditícia, transporte, comercialização, exportação e serviços portuários, dentre outros. Nesse contexto, a lavoura canavieira assume papel relevante no cenário socioeconômico, representando uma fonte de geração de empregos e renda no setor industrial e rural.

Existe atualmente uma grande expectativa de contínuo crescimento do setor sucroalcooleiro, alavancado pela escassez das reservas de petróleo e pela preocupação da sociedade com a iminência de mudanças climáticas. A ocorrência desses fatores gera uma enorme pressão sobre o uso de combustíveis fósseis, aumentando a demanda pelo álcool, no Brasil e no exterior. A cana-de-açúcar é uma das melhores opções dentre as fontes de energia alternativa e a que estabelece a melhor relação custo-benefício (CESNIK e MIOCQUE, 2004).

A região Nordeste ocupa a terceira posição no ranque da produção nacional com mais de 64 milhões de toneladas, respondendo a aproximadamente 12% da produção nacional. Pernambuco apresenta uma produção superior a 19 milhões de toneladas de cana-de-açúcar destinada a indústria sucroalcooleira, sendo classificado como o segundo maior produtor do Nordeste (CONAB, 2009).

Os investimentos no melhoramento genético das culturas situam-se entre as prioridades governamentais e da iniciativa privada atuante no setor agrícola de vários países. Esses investimentos aumentaram em mais de dez vezes a produtividade mundial da maioria das culturas. No Brasil, particularmente no Nordeste, destacam-se as variedades RB (República Brasileira) lançadas pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA, da qual faz parte o Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA) da UFRPE. A variedade RB 872552 é recomendada para plantios de verão com colheita no final da safra; apresenta como características agroindustriais: maturação precoce, teor alto de sacarose e médio de fibras, bom perfilhamento e fechamento entrelinhas, com alta produtividade agrícola e industrial e, como consequência, elevada produção de açúcar por área. Seus destaques são a riqueza, produtividade e adaptabilidade (RIDESA, 2005).

O cultivo de variedades de cana-de-açúcar detentoras de boas características agroindustriais representa, na prática, a tecnologia que mais contribui para a melhoria dos coeficientes de produtividade da cultura, a níveis relativamente baixos, quando comparada com os demais itens que compõem o sistema produtivo.

2.2. Cultura de tecidos

A cultura de tecidos envolve um conjunto de técnicas, mediante as quais um explante (parte isolada de uma planta, como protoplastos, células, tecidos e órgãos) é cultivado de forma asséptica em um meio nutritivo, sob condições controladas de temperatura e luminosidade (SOUZA et al., 2006). Seu início se deu nos anos 30, porém só logrou maior impulso nos anos 70, com crescente interesse, tanto na aplicação em nível comercial como para auxiliar programas de melhoramento genético (GYVES, 1994).

Possibilitando uma versatilidade de aplicações na biotecnologia vegetal, a cultura de tecidos tem como finalidade primária dirigir o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado em seu redor. Este controle depende de fatores externos, químicos e físicos, como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais (VASIL, 1987), e também de fatores inerentes ao material vegetal, como fatores hereditários, estado fisiológico do explante e da planta que lhe deu origem (THORPE et al.,1991). De acordo com Souza et al. (2006), suas técnicas apresentam grande potencialidade e tem se constituído um instrumento valioso para o desenvolvimento da agricultura, especialmente quando associadas às áreas de melhoramento genético, fitossanidade e fitotecnia. Entre outras, pode-se destacar as seguintes vantagens como aquelas de maior relevância: obtenção de elevado número de mudas com alta qualidade genética em espécies economicamente importantes ou com dificuldade de propagação; período de tempo relativamente curto para produção das plantas; necessidade de espaço físico menor que o exigido nos processos convencionais de multiplicação; oportunidade de eliminação de vírus e outros patógenos, propiciando a propagação de plantas com alto grau de fitossanidade; conservação de bancos de germoplasma *in vitro*, evitando a erosão genética que tem se intensificado a cada dia.

No melhoramento genético de plantas, a cultura de tecidos tem sido utilizada de várias formas no desenvolvimento de variedades cultivadas; em geral, suas técnicas são aplicadas na obtenção linhagens homozigóticas; seleção de genótipos superiores a partir de di-haplóides; para viabilizar cruzamentos interespecíficos; produzir mutantes com potencialidades agrônômicas e promover uma rápida propagação clonal de genótipos melhorados, a fim da difusão desse novo material (CARVALHO, 1999; FERREIRA, 2006).

Dentre as técnicas aplicadas na cultura de tecidos, a mais promissora e de maior impacto na agricultura é a propagação vegetativa *in vitro*, ou micropropagação, a qual pode ser conduzida de três maneiras: (1) a partir da multiplicação por meio de gemas; (2) a partir da multiplicação mediante indução de gemas adventícias, ou seja, por organogênese; (3) ou a partir da multiplicação via embriogênese somática (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A micropropagação da cana-de-açúcar vem se desenvolvendo com sucesso e tem conseguido bastante aplicabilidade, facilitando a rápida multiplicação das novas variedades melhoradas e garantindo a produção de mudas livres de pragas e

doenças, passíveis de transmissão pelos métodos tradicionais de propagação. As novas plantas têm sido regeneradas a partir de meristemas apicais e axilares e de tecidos de folhas imaturas (CESNIK e MIOCQUE, 2004; LEMOS, 2009).

2.3. Morfogênese *in vitro*

Segundo Cooper (2001), a morfogênese *in vitro* se refere ao surgimento de qualquer parte da planta a partir de células ou tecidos que originalmente não possuem essa forma ou estrutura. Portanto, o estudo da morfogênese vegetal tem como objetivo fundamental identificar os processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos que conduzem essa aparição de novas estruturas organizadas no corpo da planta.

O processo morfogenético é resultado da divisão e diferenciação celular organizada que dependem, basicamente, da atividade e expressão de determinados genes. A diferenciação celular reflete, em última análise, o efeito de, pelos menos, três grupos de fatores. O primeiro é o fator genético, que incorpora o estoque de potencialidades que podem ser expressas durante o desenvolvimento; o segundo fator está representado pelas características originadas durante a ontogênese e, por último, existem as características cuja expressão depende apenas do ambiente (KERBAUY, 1999). O desenvolvimento organizado depende de certos sinais específicos e de uma conseqüente mudança no metabolismo, além da capacidade de recepção dos sinais pelas células.

Costa et al. (2006) consideram a ocorrência de dois padrões morfogênicos *in vitro*: morfogênese direta, quando os órgãos ou embriões se originam diretamente do explante, sem formação de calos (massa celular pouco diferenciada, de proliferação contínua e desordenada); e a morfogênese indireta, quando há prévia formação de calo antes do desenvolvimento de estruturas organizadas (Figura 1). Seguir o padrão indireto é uma das respostas mais comuns de um tecido cultivado *in vitro*, o qual depende dos seguintes estádios: desdiferenciação, competência, indução, determinação e diferenciação.

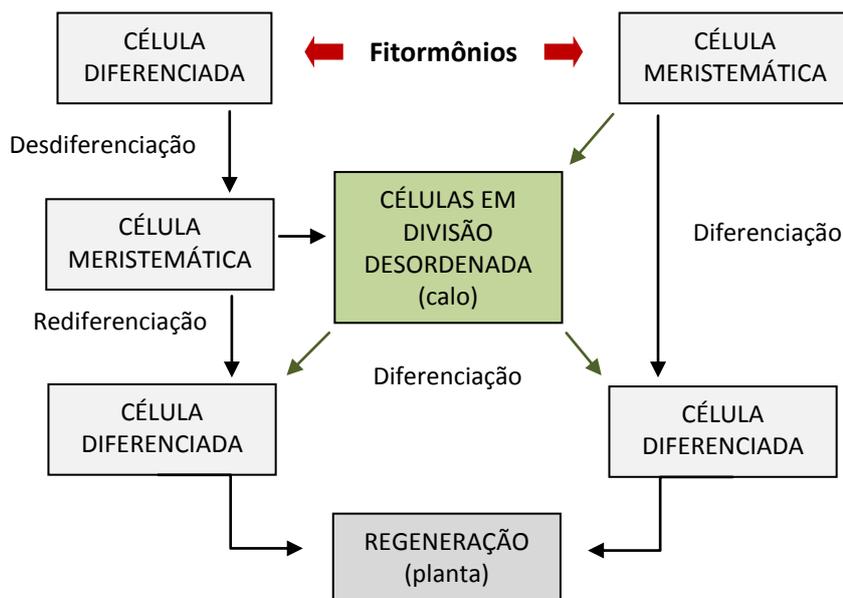


Figura 1. Representação esquemática das possíveis etapas do processo morfogênico *in vitro*. Adaptado de COSTA et al., (2006).

Quando as células são liberadas do controle a que estavam sendo submetidas no organismo íntegro e são expostas a uma nova condição (meio de cultura), podem se desdiferenciar com a possibilidade do genoma ser expresso de outras formas, levando-as a novos padrões de diferenciação, para então, formar novas estruturas organizadas. A desdiferenciação inicial dos explantes resulta na formação de células competentes aos efeitos estimulatórios do meio de cultura, as quais, após transferência para meios específicos à formação de propágulos, tornam-se determinadas (HANDRO e FLOH, 1990; KERBAUY, 1999).

A indução, portanto, é o desencadeamento de um processo morfogênético pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico, que pode incitar a competência celular, definida como a capacidade das células em reagir a sinais específicos de desenvolvimento (GUERRA et al., 1999). A partir da diferenciação, os novos tecidos se arranjam de forma a constituir novos órgãos (organogênese direta ou indireta) ou embriões (embriogênese somática direta ou indireta) que vão crescendo e promovendo alterações morfológicas visíveis.

Nesse contexto, a micropropagação baseia-se no conhecimento morfogênético decorrente dos processos celulares integrados de divisão, crescimento e diferenciação. De acordo com Handro e Floh (1990), tais processos dependem de certos sinais (principalmente fitormônios e luz) que, agindo direta ou

indiretamente em nível gênico, desencadeiam processos específicos de síntese, e conseqüentemente, alterações bioquímicas e metabólicas diversas. A expressão morfogênética é, por conseguinte, a resposta final em dois níveis básicos: embriogênese somática e organogênese.

2.4. Embriogênese somática

A embriogênese somática (ES) é um caso particular de morfogênese, que pode ser descrita como o processo a partir do qual estruturas bipolares semelhantes a embriões zigóticos se desenvolvem de células somáticas, seguindo uma seqüência de estádios característicos da embriogênese zigótica, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Esta técnica baseia-se na teoria da totipotencialidade das células vegetais, postulada por Haberlandt, onde, teoricamente, as células somáticas contêm toda a informação genética necessária para a geração de uma nova planta (GUERRA et al., 1999; JIMÉNEZ, 2001; ARNOLD et al., 2002). Desse modo, a ES converteu-se em um sistema modelo para o estudo dos eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos que ocorrem durante o início e desenvolvimento da embriogênese em plantas superiores (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

A técnica de embriogênese somática apresenta diversas vantagens, como alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação; plantio direto da muda obtida, com menor custo de produção e a possibilidade de transferência de genes, razão pela qual tem sido utilizada como ferramenta em estudos de desenvolvimento de plantas, propagação clonal e melhoramento (BARROS, 1999). Para este último, a embriogênese oferece muitos benefícios, particularmente em resposta a fusão de células, a introdução de genes de interesse e a produção massiva de embrióides, para a subsequente produção de sementes sintéticas ou artificiais. (MARCANO et al., 2002).

O desenvolvimento de tipos celulares embriogênicos e não embriogênicos pode ser influenciado por diferentes fatores como: genótipo, idade e estágio de desenvolvimento do explante, estado fisiológico da planta doadora dos explantes e ambientes externos que incluem composição do meio de cultura e condições físicas de cultivo. Interações entre todos esses fatores conduzem à indução e à expressão de um modo específico de diferenciação celular e desenvolvimento (FEHÉR et al.,

2002; GAJ, 2004). É normalmente após uma mudança em uma ou mais condições de cultura que tecidos ou células induzidas alcançam o estágio de expressão, no qual as células exibem sua competência embriogênica e se diferenciam em embriões somáticos (JIMÉNEZ, 2005).

A indução do processo de embriogênese somática em células vegetais está associada à ativação da divisão celular, o que requer a ação de reguladores de crescimento exógenos, mas especificamente auxinas e citocininas (FEHÉR et al., 2002). No entanto, ao lado de uma grande variação de tipos indutores, a ES não pode ser definida apenas como uma resposta específica a um ou mais reguladores de crescimento exógenos aplicados. Muitas das observações indicam um papel crítico do estresse como um estímulo embriogênico. Os níveis endógenos de fitoreguladores podem ser considerados como um dos maiores fatores em determinar a especificidade de resposta celular destes estímulos gerais de estresse (FEHÉR et al., 2003).

De acordo com Sharp et al. (1980), existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática *in vitro*, o primeiro corresponde ao modelo direto (embriogênese direta), no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes sem a formação de estádios intermediários de calo e o segundo padrão refere-se ao modelo indireto (embriogênese indireta), no qual os embriões são formados a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de determinação, as quais podem adquirir novas competências, mediadas por mensageiros químicos específicos. Independente do padrão direto ou indireto, as células-mães embriogênicas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa. Essas características incluem um tamanho reduzido ou variando entre 100-200 µm, conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucleólos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido. As propriedades histoquímicas dessas células indicam intensa atividade metabólica e de síntese de RNA (VASIL, 1982; GUERRA et al., 1999; MATHEW e PHILIP, 2003).

O padrão de desenvolvimento do embrião somático em Liliopsida (Figura 2) é diferente do que ocorre em Magnoliopsida (dicotiledôneas). Inicialmente, ambos são caracterizados pela diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular; porém, enquanto as dicotiledôneas passam pelos estádios embrionários conhecidos como globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, as

monocotiledôneas exibem um estágio globular, e posteriormente, desenvolvem estruturas semelhantes ao escutelo e coleótilo (BRANDÃO, 2007).

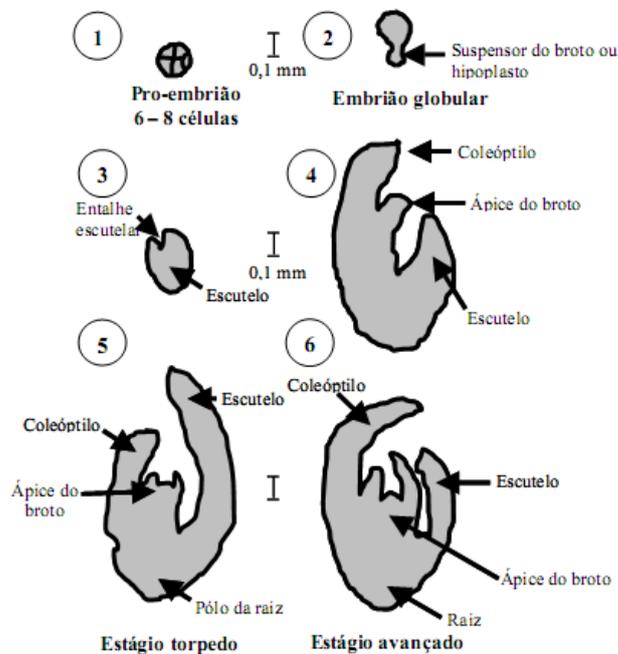


Figura 2. Esquema dos estágios da embriogênese em Liliopsida. Adaptado de BRANDÃO (2007).

Em Liliopsidas, o estabelecimento da competência das culturas de células foi difícil. No final dos anos 70 e 80 muitos trabalhos relataram um forte efeito do genótipo na capacidade de regeneração da cultura (SMITH, 2000). Por um longo período, as Liliopsidas foram consideradas recalcitrantes para as manipulações *in vitro*; porém, a utilização de tecidos meristemáticos e embriogênicos para iniciar o cultivo, permitiu o desenvolvimento dessas manipulações em gramíneas e cereais. Explantes como embriões e folhas imaturas e inflorescências jovens têm sido utilizados para iniciar culturas embriogênicas capazes de regenerar plantas de milho (GREEN e PHILLIPS, 1975; SONGSTAD et al., 1992; FERNANDES et al., 2008), trigo (OZIAS-AKINS e VASII, 1982; MAHALAKSHMI et al., 2003), aveia (RINES e MCCOY, 1981; GRANDO et al., 1993), sorgo (GAMBORG ET AL., 1977; GIRIJASHANKAR et al., 2007) e capim elefante (WANG e VASIL, 1982; CAMPOS et al., 2009). Em cana-de-açúcar, a regeneração de plantas a partir da embriogênese somática iniciou-se com os estudos de Ho e Vasil (1983) e vem sendo descrita com diferentes explantes e para um grande número de variedades (MANICKAVASAGAM

e GANAPATHI, 1998; GILL et al., 2004; LAKSHMANAN, 2006; ALI et al., 2007; HEERDT, 2008). No entanto, a resposta morfogenética dos tecidos está sob influência hormonal e é genótipo-dependente (TAYLOR, 1994), tornando necessário seu estudo em diferentes variedades. O entendimento específico de processos de indução, multiplicação e maturação dos embriões somáticos pode levar ao desenvolvimento de processos automatizados de embriogênese somática, diminuindo a mão-de-obra e barateando a sua utilização.

2.5. Estresse oxidativo: espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidativas

Uma das mais importantes funções das células das plantas é sua habilidade em responder às flutuações ambientais. Entender as conexões entre as respostas iniciais das plantas aos variados tipos de estresse, que conferem a ela sucesso no ajuste às condições de crescimento alteradas, é uma das grandes metas da biologia de plantas (GRENE, 2002).

Processos metabólicos tais como a respiração e a fotossíntese, naturalmente produzem como sub-produtos diferentes espécies reativas de oxigênio (ROS - reactive oxygen species) nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Moléculas de ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radicais hidroxila ($HO\bullet$) são capazes de reagir com as demais classes de biomoléculas, como proteínas, fosfolipídeos e DNA, afetando a integridade e função das células. No entanto, em baixas concentrações elas atuam como moléculas sinalizadoras nos processos de crescimento e desenvolvimento celular (DEL RÍO et al., 2006). ROS também podem ser geradas por processos metabólicos como autooxidação de pequenas moléculas (hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, ferredoxinas reduzidas) produzindo $O_2^{\bullet-}$. Além disso, fatores ambientais, como irradiação, poluição ambiental e produtos tóxicos são potenciais geradores de ROS (HENRIQUES et al., 2001).

As propriedades citotóxicas das ROS, levaram ao desenvolvimento de complexos mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos de neutralização dessas espécies (MØLLER et al., 2007; APEL e HIRT, 2004). No entanto, o equilíbrio entre a produção e a neutralização pode ser alterado, aumentando significativamente os níveis intracelulares dessas moléculas quimicamente ativas, ocasionando o chamado “estresse oxidativo” (APEL e HIRT, 2004).

O papel das ROS durante o crescimento e morfogênese vem sendo investigado, sugerindo que essas moléculas não são apenas simples sinalizadoras do estresse, mas apresentam também fundamental importância na sinalização do crescimento e desenvolvimento das plantas (OBERT et al., 2005; MERATAN et al., 2009). Essas espécies reativas induzem mudanças no padrão de expressão gênica, metabolismo celular e totipotência, importantes para a competência embriogênica em células somáticas, portanto, acredita-se que um certo nível de estresse oxidativo é requerido para promover a formação de células embriogênicas e desencadear uma rota morfogênica específica (BLAZQUEZ et al., 2009).

Incluída na resposta ao estresse oxidativo celular está a regulação da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, as quais reduzem os danos potenciais causados pelas ROS (CYRNE et al., 2003). Essas enzimas são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico, servindo como sinalizadores do estresse. Destacam-se entre elas a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO).

A superóxido dismutase é a primeira enzima que age no sistema antioxidante celular, catalisando a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxidos (OLMOS et al., 2003). Por ser uma metaloenzima, apresenta isoformas que variam conforme o metal utilizado pela enzima. Assim, tem-se a Mn-SOD, Fe-SOD e Cu/Zn-SOD, localizadas em diferentes compartimentos celulares.

A catalase tem função de converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio estável. É a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 que não consome equivalentes redutores da célula e que possui mecanismo muito eficiente para a remoção do peróxido de hidrogênio formado sob condições de estresse (MALLICK e MOHN, 2000).

As peroxidases convertem o H_2O_2 em água, além de estarem envolvidas em ligações de polissacarídeos e lignificação da parede celular e na diminuição do processo peroxidativo dos lipídios de membrana (PASTERNAK et al., 2002; LIBIK et al., 2005).

As polifenoloxidases catalisam a hidroxilação e a degradação oxidativa de compostos fenólicos (CAMPOS et al., 2004), os quais, além do papel estrutural na parede celular, exercem uma função protetora contra a ação das ROS (ALI et al., 2006). A oxidação fenólica é uma resposta característica a ferimentos no tecido vegetal (BORÉM e VIEIRA, 2005) e muito comum no cultivo *in vitro*. O teor de fenóis

e a medida da atividade das enzimas responsáveis pela oxidação fenólica podem contribuir como indicadores de estresse.

2.6. Atividade do peróxido de hidrogênio e enzimas antioxidativas durante a embriogênese somática

A embriogênese somática, como técnica para propagação clonal, tem sido tema de diferentes estudos, em especial, com abordagens morfológicas e citohistológicas (FLOH et al., 2008). No entanto, deve-se destacar que as limitações impostas pela falta de estudos básicos sobre a ontogênese dos embriões zigóticos e somáticos, nos seus aspectos fisiológicos e bioquímicos, complementados com a caracterização molecular, torna frequentemente, os protocolos de cultivo *in vitro* bastante empíricos e pouco eficientes.

Como outros processos do desenvolvimento vegetal, a embriogênese somática compreende diversas fases fisiológicas com diferentes requerimentos (KEVERS et al., 2002). As fases iniciais dessa via morfogênica são caracterizadas pela indução de muitos genes relacionados ao estresse, o que leva à hipótese de que a embriogênese somática é uma resposta extrema ao estresse de células de plantas cultivadas *in vitro* (PASTERNAK et al., 2002). De fato, a competência embriogênica de células somáticas pode ser estimulada por vários fatores reconhecidos como agentes estressantes, tais como: alta pressão osmótica (CHOI et al., 1998; AKULA et al., 2000; IKEDA-IWAI et al., 2003), metais pesados ou variações no pH do meio (PASTERNAK et al., 2002), deficiência nutricional e/ou hídrica (LEE et al., 2001; KUMRIA et al., 2003), entre outros.

De uma maneira geral, os agentes indutores de estresse podem provocar uma reação em células somáticas que se manifesta pela desdiferenciação e rediferenciação em embriões somáticos. Sob condições extremas, as células têm que mudar sua rota: ou elas morrem (apoptose), ou se diferenciam e dividem (FEHÉR et al., 2003). Essa plasticidade ocorre tanto em células meristemáticas como em células diferenciadas, as quais retêm a habilidade de expressar genes ou podem readquirir este potencial pela desdiferenciação e, então, manter-se potencialmente competentes (JOYCE et al., 2003). O fracasso em compensar um estresse severo pode resultar em variação somaclonal ou mutação (CASSELLS et

al., 1999; CASSELLS e CURY, 2001), perda total da totipotência organogênica (GASPAR et al., 1998) e morte da planta ou da célula (BRAY et al., 2000).

As células vegetais possuem sistemas bem desenvolvidos para regular o nível de ROS, e as concentrações dessas moléculas quimicamente ativas podem sofrer alterações, entre outros motivos, pela ação de várias enzimas antioxidantes, que são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse (MITTLER, 2002).

Mais recentemente, alguns experimentos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer o papel do estresse oxidativo na morfogênese vegetal (TANG e NEWTON, 2005; MERATAN et al., 2009; KONIECZNY et al., 2008; BLAZQUEZ et al., 2009). O estudo das respostas antioxidantes durante os eventos morfogênicos da embriogênese somática tem sido feito principalmente com amostras de calos nos estádios críticos de indução e desenvolvimento da embriogênese somática e de conversão dos embriões em plantas.

Alguns autores correlacionam as mudanças na atividade de enzimas antioxidativas com a resposta embriogênica dos tecidos somáticos, sugerindo que o aumento da atividade dessas enzimas estaria relacionado ao estresse oxidativo e que esse estresse contribuiria para acelerar o processo de embriogênese somática (LIBIK et al., 2005; GANESAN e JAYABALAN, 2004; CUI et al., 1999; KONIECZNY et al., 2008). Dentre a maquinaria antioxidativa, destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD). O produto da atividade da SOD é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é tóxico em níveis elevados e precisa ser reduzido à H_2O em reações subsequentes. Nas plantas, os níveis intracelulares de H_2O_2 são regulados, principalmente, pela CAT e POD. Assim, estas enzimas podem ser consideradas como possíveis “marcadores da morfogênese” (KONIECZNY, 2008).

Libik et al. (2005) relataram a presença de isoformas da superóxido dismutase e catalase através da eletroforese em calos embriogênicos e embriões somáticos de *Mesembryanthemum crystallinum*. Ganesan e Jayabalan (2004) detectaram um aumento na atividade da superóxido dismutase e peroxidase nos calos de *Gossypium hirsutum* L., os quais produziram maior quantidade de embriões somáticos.

Cui et al. (1999) mostraram a mudança na atividade das enzimas antioxidantes e o efeito do H_2O_2 exógeno na frequência da embriogênese somática em *Lycium*

barbarum L. Seus resultados apontaram que a atividade da superóxido dismutase aumentou gradualmente nos primeiros dias de cultivo, diminuindo com as divisões adicionais e o desenvolvimento de embriões multicelulares; enquanto que a atividade da peroxidase e catalase foi alta em calos e decaiu rapidamente nos primeiros dias da diferenciação, sugerindo que um aumento intracelular de H_2O_2 foi determinante na formação de células embriogênicas. A embriogênese somática em *Lycium barbarum* L. também foi estimulada pela adição de até 200 mM de H_2O_2 ao meio de diferenciação, enquanto que a concentração de 300 mM foi inibitória por promover o aumento dos níveis endógenos a patamares tóxicos. Os autores sugerem que o H_2O_2 endógeno atua como um mensageiro celular capaz de induzir a expressão de genes e a síntese protéica, promovendo a embriogênese somática. O H_2O_2 age numa rota dupla nas plantas: em baixas concentrações, atua como um mensageiro molecular envolvido na sinalização adaptativa, disparando a tolerância a vários estresses abióticos e, em altas concentrações, promove a morte celular programada (KARPINSKI, et al., 1999; DAT, et al., 2000). O H_2O_2 é um possível intermediário entre o estresse oxidativo e a regeneração de plantas na cultura de tecidos.

Konieczny et al. (2008), avaliaram a atividade antioxidante e o nível de H_2O_2 durante a embriogênese somática direta de *Helianthus annuus* L. A atividade da superóxido dismutase foi obtida por análise eletroforética, mostrando a presença das isoformas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD. A atividade da peroxidase e catalase e conteúdo de H_2O_2 foi semelhante ao relatado por Cui et al. (1999) e por Grupta e Datta (2004) com cultura de *Gladiolus hybridus*, onde a produção de embriões somáticos foi precedida por declínio na atividade da catalase e da peroxidase, com um aumento no conteúdo endógeno de H_2O_2 . A essência da diferenciação e desenvolvimento de células é a expressão diferencial de genes, portanto, o metabolismo de ROS representa um papel decisivo na diferenciação e desenvolvimento celular. Assim, podemos supor que o H_2O_2 produzido devido ao desbalanço oxidativo, deve promover a expressão de alguns genes responsáveis pela indução dos processos morfogênicos.

No estudo dos componentes do sistema enzimático antioxidante durante a embriogênese somática em *Crocus sativus* L., foi detectado um aumento significativo da SOD durante a formação de calos embriogênicos, seguido por progressivo decréscimo durante os estádios de desenvolvimento dos embriões

somáticos. Também foram detectadas as isoformas Mn-SOD e Cu/Zn-SOD, com predominância desta última, a qual apresenta aumento drástico quando células vegetais se encontram sob estresse. Quanto a CAT, verificou-se uma menor atividade durante os estádios iniciais da embriogênese, com posterior aumento dessa atividade à medida que os embriões somáticos foram se desenvolvendo (BLAZQUEZ et al., 2009). No metabolismo, os padrões de isoenzimas são distintos em células embriogênicas e não-embriogênicas, implicando num papel fundamental para o estado de oxidação na diferenciação do tecido (THOMPSON e THORPE, 1991).

Outros tipos de estresses já foram relatados como indutores de embriogênese somática em diversas espécies de plantas. Este fato indica que o tratamento estressante induz uma reação comum, onde haveria a indução da expressão de fatores que controlam o início da embriogênese somática. Ikeda-Iwai et al. (2003) obtiveram embriões somáticos de *Arabidopsis thaliana* a partir de um tratamento com estresse osmótico, que consistia na inoculação do meristema apical durante 6 a 9h em meio com 0,7 M de manitol. A indução de embriogênese somática também já foi obtida a partir de estresse com macronutrientes em *Panax ginseng* (CHOI et al., 1998).

A relação entre diferentes condições de estresse e a embriogênese somática ainda não está bem entendida, no entanto, as informações apresentadas sugerem uma forte conexão entre estes fatores, sendo a embriogênese somática uma rota seguida em resposta ao estresse (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). Lichtenthaler (1998) propôs que a resposta fisiológica a condições de estresse é dependente de dois fatores, o estágio fisiológico das células do explante e o nível (tempo e intensidade) da condição de estresse. Quando o nível de estresse excede a tolerância celular, leva à morte das células, mas se o nível de estresse é inferior à tolerância, as células podem induzir mecanismos de adaptação.

Dentre as principais limitações na maturação e conversão dos embriões está o restrito conhecimento das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento e maturação do embrião zigótico. Assim, a determinação dos padrões bioquímicos durante o desenvolvimento embrionário pode fornecer subsídios para a otimização dos sistemas de propagação *in vitro* baseados na embriogênese somática (PULLMAN et al., 2003).

Desse modo, é requerido um detalhado conhecimento dos fatores que interferem na diferenciação, a qual pode ser afetada por manipulações do ambiente de cultivo e pelo estado fisiológico do explante, não sendo um fenômeno simples. O sucesso da regeneração de plantas na cultura de tecidos requer o entendimento de como essas manipulações modificam fisiologicamente e bioquimicamente as células do explante em cada estágio de seu desenvolvimento.

3. Referências

- AKULA, A.; BECKER, D.; BATESON, M. High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plan recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. **Plant Cell Report**, v.19, p.1140-1145, 2000.
- ALI, A.; NAZ, S.; IQBAL, J. Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Pakistan Journal of Botany**, v.39, p.1961-1977, 2007.
- ALI, M.B.; SINGH, N.; SHOHAEL, A.M.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Phenolic metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. **Plant Science**, v.171, p.147-154, 2006.
- APEL, K. e HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.
- ARENCIBIA, A. Gene transfer in sugarcane. In: HOHN, T.; LEISINGER, K.M. **Biotechnology of Food Crops in Developing Countries**. New York: Springer-Verlag, 1998, p.79-104.
- ARNOLD, S.V.; SABALA, I.; BOZHKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L.; Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.233-249, 2002.
- BARROS, L.M. Embriogênese Somática. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, v.2, n.7, p.36-39, 1999.
- BLAZQUEZ, S.; OLMOS, E.; HERNÁNDEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ, J.A.; PIQUERAS, A. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.97, p.49-57, 2009.
- BORÉM, A.; VIEIRA, M.L.C. **Glossário de Biotecnologia**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2005. 126p.
- BRANDÃO, R.L. **Transformação genética de *Sorghum bicolor* (L. Moench) visando tolerância ao AL⁺³**. 2007. Tese (Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1189-1197.
- CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E.P. DA; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CAMPOS, J.M.S.; CALDERANO, C.A.; PEREIRA, A.V.; DAVIDE, L.C.; VICCINI, L.F.; SANTOS, M.O. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.1, p.38-44, 2009.

CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de Micropropagação**. Embrapa Algodão. Campina Grande: Embrapa - CNPA - Documentos, 64, 1999. 39p.

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

CASSELLS, A.C.; JOYCE, S.M.; CURY, R.F.; MCCARTHY, T.F. Detection of economically important variability in micropropagation. In: ALTMAN, A.; IZHAR, S.; ZIV, M. **Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999.

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

CHOI, Y.E.; YANG, D.C.; CHOI, K.T. Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.52, p.177-181, 1998.

CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.3, p.385-391, 2006.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2009/2010, segundo levantamento, setembro/2009. 2009. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 07 set. 2009.

COOPER, G.M. **A Célula: uma abordagem molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2001. 712p.

COSTA, M.A.P.C.; SOUZA, A.S.; ALMEIDA, W.A.B. Morfogênese *in vitro*. In: SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p.115-130.

CUI, K.; XING, G.; LIU, X.; XING, G.; WANG, Y. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant science**, v.146, p.9-16, 1999.

CYRNE, L.; MARTINS, L.; FERNANDES, L.; MARINHO, H.S. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, p.385-393, 2003.

DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVÁ, E., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D.; BREUSEGEM, F.V. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.57, p.770-795, 2000.

- DEL RÍO, L.A.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; PALMA, J.M.; BARROSO, J.B. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**, v.141, p.330-335, 2006.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; OTVOS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, v.57, n.1, p.5-12, 2002.
- FERNANDES, E.H.; PRIOLI, A.J.; SCAPIM, C.A.; SCHUSTER, I.; VIEIRA, E.S.N.; AMARAL JR., A.T.; MORTELE, L.M. Embriogênese somática a partir de embriões imaturos em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, p.2604-2607, 2008.
- FERREIRA, P.V. Técnicas biotecnológicas usadas no melhoramento de plantas. **Melhoramento de Plantas – Tópicos especiais**. Maceió: EDUFAL, 2006. p.617-635.
- FLOH, E.I.S.; SANTA-CATARINA, C.; VANILDO, S. **Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese *in vitro***. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/publi/banco/index?show+129212167>> Acesso em: 01 nov. 2008.
- GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v.43, p.27-47, 2004.
- GAMBORG, O.L.; SHYLUK, J.P.; BRAR, D.S.; CONSTABEL, F.; Morphogenesis and plant regeneration from callus of immature embryos of sorghum. **Plant Science**, v.10, p.67-74, 1977.
- GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Reports**, v.23, p.181-187, 2004.
- GASPAR, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; LE DILLY, F. Atypical metabolism and biochemical cycles imposing the cancerous state on plant cells. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.135-144, 1998.
- GEIJSKES, R.J.; WANG, L.; LAKSHMANAN, P.; MCKEON, M.G.; BERDING, N.; SWAIN, R.S.; ELLIOT, A.R.; CROF, C.P.L.; JACKSON, J.A.; SMITH, G.A. SmartSett™ seedlings: tissue cultured seed plants for the Australian sugar industry. **Sugar Cane International**, p.13-17, 2003.
- GILL, N.K.; GILL, R.; GOSAL, S.S. Factors enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Indian Journal of Biotechnology**, v.3, p.119-123, 2004.

GIRIJASHANKAR, V.; SHARMA, K.K.; BALAKRISHNA, P.; SEETHARAMA, N. Direct somatic embryogenesis and organogenesis pathway of plant regeneration can seldom occur simultaneously within the same explant of sorghum. **Journal published by ICRISAT**, v.3, n.1, p.3, 2007.

GRANDO, M.F.; EICHLER, L.; TANABE, C.R.; SANTOS, J.F.; SANTOS, C.M. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.2, n.5, p.139-144, 1993.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.1, Brasília: Embrapa - SPI/ Embrapa - CNPH, 1998. p.183-241.

GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.J. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, Madison, v.15, p.417-421, 1975.

GREENE, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. In: SOMERVILLE, C.R.; MEYEROWITZ, E.M. **The Arabidopsis Book**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2002.

GRUPTA, S.D.; DATTA, S. Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidant on plant regeneration. **Plant Biology**, v.47, p.179-183, 2004.

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

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

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**, Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, 1990. p.203-211.

HEERDT, E. **Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar**. 2008. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C.M.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2001. p.651-666.

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

IKEDA-IWAI, M.; UMEHARA, M.; SATOH, S.; KAMADA, H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. **The plant journal**, v.34, p.107-114, 2003.

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

JIMÉNEZ, V.M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p. 196-223, 2001.

JOYCE, S.M.; CASSELLS, A.C.; JAIN, S.M. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.103-121, 2003.

KARPINSKI, S.; REYNOLDS, H.; KARPINSKA, B.; WINGSLE, G.; CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. **Science**, v.284, p. 654-657, 1999.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em culturas de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, 1999. p.519-531.

KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J. The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng* *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.70, p.181-188, 2002.

KONIECZNY, R.; LIBIK, M.; TULEJA, M.; NIEWIADOMSKA, M. Oxidative events during *in vitro* regeneration of sunflower. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, p.71-79, 2008.

KUMRIA, R.; SUNNCHAN, V.G.; DAS, D.K.; GUPTA, S.K.; REDDY, V.S.; BHATNAGAR, R.K.; LEELAVATHI, S. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. **Plant Cell Reports**, v.21, p.635-639. 2003.

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

LEE, E.K.; CHO, D.Y.; SOH, W.Y. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. **Plant Cell Report**, v.20, p.408-415, 2001.

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

LIBIK, M.; KONIECZNY, R.; PATER, B.; SLESIAK, I.; MISZALSKI, Z. 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**, v.23, p.834-841, 2005.

LICHTENTHALER, H.K. The stress concept in plants: an introduction. **New York Academy of Sciences**, v.851, p.187-198, 1998.

MAHALAKSHMI, A.; KHURANA, J.P.; KHURANA, P. Rapid induction of somatic embryogenesis by 2,4-D in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) **Plant Biotechnology**, v.20, n.4, 267-273, 2003.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response to alga cells. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.183-193, 2000.

MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of sugarcane. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.36, p.832-835, 1998.

MARCANO, A.K.; GUEVARA, P.M.; OROPEZA, M.; GARCÍA, E. Optimización del proceso de embriogénesis somática en variedades venezolanas de caña de azúcar. **Revista Acta Científica Venezolana**, Caracas, v.53, n.4, p.1-24, 2002.

MATHEW, M.M; PHILIP, V.J. Somatic embryogenesis *versus* zygotic embryogenesis in *Ensete superbum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v.72. p.267-275, 2003.

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

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

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

NIEVES, N.; SEGURA-NETO, M.; BLANCO, M.A.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J.L.; CASTILLO, R. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.39, p.343-345, 2003.

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

OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. Early steps in oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **Journal of Experimental Botany**, v.54, p.291-301, 2003.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescence of *Triticum aestivum* L. (wheat) evidence for somatic embryogenesis. **Protoplasma**, New York, v.110, p.95-105, 1982.

PASTERNAK, T.P.; AYAYDIN, E.P.F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; ONCKELEN, H.A.V.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, v.129, p.1807-1819, 2002.

PULLMAN, G.S.; JOHNSON, S.; PETER, G.; CAIRNEY, J.; XU, N. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. **Plant Cell Reports**, v.21, p.747-758, 2003.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, p.285-301, 2006.

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Boletim Técnico de Lançamento de novas variedades RB de Cana-de-Açúcar. (Eds: SIMÕES-NETO, D.E.; MELO, L.J.O.; CHAVES, A.; LIMA, R.O.R.). Recife, Imprensa Universitária da UFRPE, Recife, 2005. 28p. (Boletim Técnico Nº 1).

RINES, H.W.; MCCOY, T.J. Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats. **Crop Science**, Madison, v.21, p.837-842, 1981.

SHARP, W.R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology on in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v.2, p.268-310, 1980.

SMITH, R. H. **Plant Tissue Culture: Techniques and experiments**. 2 ed. California: Academic press, p.107-121, 2000.

SONGSTAD, D.D.; PETERSEN, W.L.; ARMSTRONG, C.L.; Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae). **American Journal of Botany**, v.76, n.7, p.761-764, 1992.

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

SNYMAN, S.J.; MEYER, G.M.; RICHARDS, J.M.; HARICHARAN, N.; RAMGAREEB, S.; HUCKETT, B.I. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Reports**, v.25, p.1016-1023, 2006.

TANG, W.; NEWTON, R.J.; OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, v.122, p.386-395, 2004.

TAYLOR, P.W.J. Tissue culture techniques for developing disease resistance in sugarcane. In: RAO, G.P.; GILLASPIE, A.G.; UPADHYAYS, P.P.; FILLIO, A.B.;

AGNIHOTRI, V.P.; CHEN, C.T. **International books periodicals and supply service**, New Delhi, 1994. p.311-331.

THOMPSON, M.R.; THORPE, T.A. Biochemical perspectives in tissue culture for crop improvement. In: KHANNA, K.R. **Biochemical aspects of crop improvement**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.327-358.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C. e ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p.311-336

UNICA, União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. 2007. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/portalunica/?Secao=referencia>>. Acesso em: 21 ago. 2007.

VASIL, I.K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.128, p.193-218, 1987.

VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant Tissue Culture**, Tokyo: Ed. Maruzen, 1982. p.101-103.

WANG, D.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* Schum. (Napier or elephant grass). **Plant Science**, v.25, p.147-154, 1982.

CAPÍTULO II

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA NA VARIEDADE RB 872552 DE CANA-DE- AÇÚCAR E SUA CORRELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO

**Embriogênese somática na variedade RB 872552 em cana-de-açúcar e sua correlação
com o estresse oxidativo**

Marina Medeiros de Araújo Silva^{1*}

Luciana Herculano¹

Cláudia Ulisses²

Terezinha Rangel Camara³

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Agronomia, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, 52171-900, Recife, PE - Brasil.

²UFRPE, Unidade Acadêmica de Garanhuns, 55296-190, Garanhuns, PE - Brasil.

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

*Autor correspondente <marinamedeirosas@yahoo.com.br>

Somatic embryogenesis in the variety RB 872552 of sugarcane and its correlation with oxidative stress

Abstract: This work had as objective to induce somatic embryogenesis by morphogenetic pathways direct and indirect in variety RB 872552 of sugarcane and correlate it with oxidative stress. Two experiments were conducted using as explants basal segments of young leaves unexpanded; the first consisted of induction through via direct, through the use of four methodologies with different supplementations of the culture medium and incubation conditions, the second through via indirect consisted of eight treatments that differed in the combination of concentrations of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and Fe-EDTA, for callus induction. In the conversion of somatic embryos into plants was used MS medium with removal of phyto regulators in both pathways. Were also performed histological analysis and activity of antioxidant enzymes in embryogenic and non embryogenic tissues treatment of ESD. The formation of somatic embryos via direct was obtained with the combination of regulators 2,4-D and BAP (6-benzylaminopurine) and incubated under a photoperiod of 16 hours, with formation of embryos up to 81% of the explants; by indirect, we obtained embryos by the addition of 8 mg.L^{-1} 2,4-D to the culture medium. As regards antioxidant enzymes, there was increased activity of peroxidase in embryogenic tissues, while the polyphenoloxidase and catalase appeared to a lesser extent in these tissues when compared to non embryogenic and could be inferred that oxidative stress plays an important role in the induction of somatic embryogenesis in sugarcane.

Keywords: *Saccharum officinarum* L., somatic embryos, calogenesis, antioxidative enzymes, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

Embriogênese somática na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar e sua correlação com estresse oxidativo

Resumo: Este trabalho teve como objetivo induzir da embriogênese somática pelas vias morfogênicas direta e indireta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar e correlacioná-la com o estresse oxidativo. Foram realizados dois experimentos que utilizaram como explantes segmentos basais de folhas jovens não expandidas; o primeiro consistiu da indução pela via direta, através da utilização de quatro metodologias com diferentes suplementações do meio de cultura e condições de incubação; o segundo, pela via indireta, constou de oito tratamentos que diferiram quanto à combinação das concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e Fe-EDTA, para a indução de calos. Na conversão dos embriões somáticos em plantas foi utilizado o meio MS com supressão dos fitoreguladores, em ambas as vias. Também foram realizadas análises histológicas e da atividade de enzimas antioxidantes em tecidos embriogênicos e não embriogênicos dos tratamentos de ESD. A formação de embriões somáticos pela via direta foi obtida com a combinação entre os reguladores 2,4-D e BAP (6-benzilaminopurina) e incubação sob fotoperíodo de 16 horas, com formação de embriões em até 81% dos explantes inoculados; pela via indireta, obtiveram-se embriões pela adição de 8 mg.L^{-1} de 2,4-D ao meio de cultura. Quanto às enzimas antioxidativas, foi verificada maior atividade da peroxidase em tecidos embriogênicos, enquanto que a polifenoloxidase e catalase apareceram em menor quantidade nesses tecidos quando comparadas aos não embriogênicos, podendo-se inferir que o estresse oxidativo exerce papel relevante na indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum* L., embriões somáticos, calogênese, enzimas antioxidativas, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

INTRODUÇÃO

O cultivo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) abrange regiões tropicais e subtropicais de mais de 80 países, e o Brasil é o maior produtor. Pela posição de destaque que ocupa na economia mundial, a cultura da cana-de-açúcar está frequentemente inserida em programas de melhoramento genético e a propagação *in vitro* dessa espécie tem facilitado a rápida multiplicação das novas variedades e garantido a produção de mudas livres de pragas e doenças (Geijskes et al., 2001).

A embriogênese somática (ES), sistema morfogênico no qual células somáticas originam embriões sem a fusão de gametas, destaca-se entre os sistemas de micropropagação por permitir a geração de um grande número de propágulos e a regeneração de plantas transformadas. Nas fases iniciais da ES são induzidos diversos genes relacionados ao estresse, o que leva à hipótese de que essa via é uma resposta extrema de células cultivadas *in vitro*. Alguns autores têm correlacionado as mudanças da atividade de enzimas antioxidativas com a resposta embriogênica de tecidos somáticos, sugerindo que o aumento da atividade dessas enzimas está relacionado ao estresse oxidativo e que esse estresse contribui para acelerar o processo embriogênico (Gaj, 2004; Pasternack et al., 2002; Nieves et al., 2003; Blazquez et al., 2009). A ação das auxinas associada com a resposta a indutores de estresse pode ser um evento chave na reprogramação metabólica e fisiológica, que resulta na competência embriogênica de células somáticas (Fehér et al., 2003). A compreensão dos mecanismos envolvidos na indução e expressão da ES em diferentes espécies aumentará o número de genótipos passíveis de regeneração por essa via (Jiménez, 2001).

Esta pesquisa objetivou induzir a ES direta e indireta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar e avaliar possíveis correlações entre a eficiência embriogênica e a resposta ao estresse oxidativo, mediada pela atividade de enzimas do sistema antioxidativo.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal Rural de Pernambuco e constou de dois experimentos, em que foi induzida a embriogênese somática pelas vias morfogênicas direta e indireta, a partir de segmentos basais de folhas jovens não expandidas provenientes de plantas da variedade RB 872552 de cana-de-açúcar cultivadas em sistema de imersão temporária (SIT). Antes da aplicação dos tratamentos de indução de embriogênese, os explantes foram mergulhados em solução de ácido ascórbico a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ para evitar o ressecamento e prevenir a oxidação.

Experimento 1: Indução de embriogênese somática direta (ESD)

Foram estabelecidos quatro tratamentos, empregando diferentes metodologias para indução de ESD descritas para cana-de-açúcar por Snyman et al. (2006), Desai et al. (2004), Geetha & Padmanabhan (2001) e Ali et al. (2007). Os tratamentos serão doravante designados, respectivamente TS, TD, TG e TA (Tabela 1). Todas essas metodologias utilizam o meio de cultura básico MS (Murashige & Skoog, 1962), solidificado com $6,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar e com o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C , por 20 minutos.

Tabela 1- Descrição dos tratamentos de indução de embriogênese somática direta em cana-de-açúcar de acordo com metodologias descritas por Snyman et al. (2006), Desai et al. (2004), Geetha & Padmanabhan (2001) e Ali et al. (2007)

REGULADORES E ADITIVOS	TRATAMENTOS DE INDUÇÃO			
	TS	TD	TG	TA
	Snyman et al., (2006)	Desai et al., (2004)	Geetha & Padmanabhan (2001)	Ali et al., (2007)
	mg.L ⁻¹			
Ác. 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	0,6	--	3,0	3,0
Ác. Naftalenoacético (ANA)	--	0,5	--	--
Cinetina (Kin)	--	2,5	--	--
6-benzilamino purina (BAP)	--	--	0,5	0,25
Caseína	500	--	--	--
L-glutamina (Gln)	--	100	--	--
Sacarose	3,0 (%)	4,0 (%)	2,0 (%)	3,0 (%)
CONDIÇÃO DE INCUBAÇÃO	Escuro	Escuro	Fotoperíodo 16 horas	Fotoperíodo 16 horas

Todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Quarenta dias após incubação nos meios de indução de ESD, com o auxílio de estereomicroscópio, a massa de embriões somáticos formada foi separada do explante e transferida para tubos de ensaio contendo meio de conversão dos embriões em plantas. O meio de conversão consistiu de sais e vitaminas de MS com a supressão dos reguladores de crescimento. As massas de embriões somáticos foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $47 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, durante sessenta dias. Plantas com mais de 2 cm de comprimento, formadas a partir dos embriões somáticos, foram individualizadas e mantidas em meio MS para crescimento e enraizamento.

Por ocasião do subcultivo do material embriogênico para meio de conversão, amostras de explantes que formaram ou não formaram embriões (aspecto embriogênico - EE - e não embriogênico - NE, respectivamente) foram retiradas para realização de análises histológicas e da atividade de enzimas do sistema antioxidativo (peroxidase, catalase e polifenoloxidase).

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e 10 repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída por seis

tubos de ensaio com um explante por tubo, totalizando 60 explantes por tratamento. Avaliou-se a ocorrência de contaminação e de oxidação e o índice de formação de embriões somáticos (IFE= nº de explantes que formaram embriões/nº de explantes inoculados). A eficiência da ESD (E_{emb}) de cada tratamento foi estimada considerando o número de plantas regeneradas a partir dos explantes que formaram embriões e foram transferidos para meio de regeneração.

Foi feita análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT (Silva & Azevedo, 2002). Os valores do IFE foram transformados com $\sqrt{x+0,5}$.

- *Atividade enzimática em tecidos embriogênicos (EE) e não embriogênicos (NE):*

As análises de atividade das enzimas antioxidativas, peroxidase (POD), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PPO), foram realizadas em amostras de explantes com aspecto embriogênico (EE), que formaram embriões, e com aspecto não embriogênico (NE), que não formaram embriões somáticos. As amostras de explantes foram coletadas após quarenta dias de permanência nos meios de indução de embriogênese, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (-20 °C). Nos tratamentos TS e TD ocorreram contaminações microbianas e intensa oxidação dos explantes que impediram a realização das análises enzimáticas. A determinação da atividade enzimática foi feita com três repetições, utilizando 0,1 g de tecido vegetal que foi homogeneizado a frio em tampão fosfato e polivinilpirrolidona, centrifugado a 10.000g e a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o preparo do extrato. A leitura foi feita em espectrofotômetro, seguindo as metodologias de Fatibello-Filho & Vieira (2002) para a determinação da peroxidase (POD), de Kar & Mishra (1976) para a polifenoloxidase (PPO) e de Berris & Sizer (1952) para a catalase (CAT).

A ANOVA dos dados das análises enzimáticas foi realizada considerando um fatorial 2x2, constituído pelos tratamentos indutores de embriogênese somática (TG e TA) e o aspecto

morfogênico dos explantes (EE e NE). A comparação de médias entre os tratamentos foi feita pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT (Silva & Azevedo, 2002).

- *Análise histológica por microscopia óptica:*

Para a obtenção de cortes anatômicos, amostras de explantes contendo embriões somáticos foram fixadas em FAA₅₀ (formaldeído: ácido acético glacial: etanol 50%, na proporção de 1:1:8); desidratadas em série etanólica ascendente e infiltradas em parafina, de acordo com Johansen (1940).

O material emblocado foi seccionado em micrótomo rotativo, com 5 µm de espessura. Para o preparo das lâminas, os cortes foram submetidos ao processo de coloração com safrablau (azul de astra e safranina) e Sudan III (Kraus & Arduin, 1997); as imagens foram obtidas em fotomicroscópio Olympus CH30 e capturadas com a utilização do programa VD 480 optimedical.

Experimento 2: Indução de embriogênese somática indireta (ESI)

Para indução desta via morfogênica foram utilizadas combinações entre diferentes concentrações de 2,4-D (0, 2, 4 e 8 mg.L⁻¹) e ferro (10 ou 100 mL.L⁻¹) acrescidas ao meio MS básico, que constituíram oito tratamentos: T1 = D0F10 (corresponde ao meio MS básico); T2 = D0F100; T3 = D2F10; T4 = D2 F100; T5 = D4F10; T6 = D4F100; T7 = D8F10; T8 = D8F100. Acrescentou-se ao meio MS 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de agar. O pH foi ajustado a 5,8 e a esterilização foi feita como descrito no experimento anterior. Os cultivos foram mantidos no escuro sob temperatura de 27 ± 2°C, durante quatro semanas. Após este período, os explantes que formaram calos foram subcultivados para o mesmo meio e incubados sob fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 47 µmol.m⁻²s⁻¹. Ao término de mais

quatro semanas os calos foram transferidos para meio MS básico, sem adição de reguladores de crescimento, para a conversão de embriões somáticos.

O experimento obedeceu a um fatorial 4x2 em delineamento experimental inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento. Cada repetição era constituída por 1 frasco com 5 explantes, totalizando 100 explantes por tratamento. Realizaram-se avaliações quanto à oxidação, textura e coloração dos calos, além do cálculo do índice de formação de calos (IFC= n° de explantes que formaram calos/n° de explantes inoculados). Os dados do IFC foram transformados por $\sqrt{x+0,5}$ para análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT (Silva & Azevedo, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Indução de embriogênese somática direta (ESD)

A partir do 3° dia de cultivo, todos os explantes inoculados apresentaram oxidação, principalmente nas extremidades. Esse processo ocorre a partir da liberação de compostos fenólicos por células danificadas pelo corte, levando à formação de quinonas que se difundem no meio de cultura escurecendo-o. As quinonas além de serem tóxicas, podem afetar o desenvolvimento dos tecidos (Grattapaglia & Machado, 1998). Nos tratamentos TG e TA, entretanto, a ocorrência de oxidação não se constituiu como fator limitante para a formação e o desenvolvimento de embriões somáticos. A formação dos mesmos se deu a partir do tecido foliar mais interno que se projetou para o exterior da extremidade basal dos explantes. Oito dias após a inoculação dos explantes *in vitro* observou-se o início de nodulações na extremidade do tecido que evoluíram para pró-embriões (Figura 1).

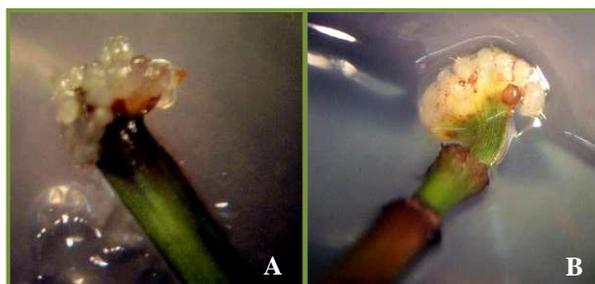


Figura 1- Embrigênese somática direta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar. Embriões formados a partir de segmentos basais de folhas jovens não expandidas aos 40 dias de cultivo: (A) tratamento TG segundo metodologia de Geetha & Padmanabhan (2001); (B) tratamento TA segundo metodologia de Ali et al., (2007).

Após 40 dias de indução de ESD, a formação de embriões foi maior nos explantes incubados no tratamento TA do que no TG, com IFE de 0,416 e 0,816, que representam mais de 41% e de 81% de explantes com embriões, respectivamente (Tabela 2). Não houve formação de embriões nos tratamentos TS e TD, nesses tratamentos registrou-se o surgimento de bactérias endofíticas. Ao contrário dos tratamentos TG e TA, nos quais não ocorreu crescimento microbiano, a incubação dos explantes dos tratamentos TS e TD foi feita em ausência de luz. As condições físicas da sala de incubação, tais como luminosidade e temperatura podem afetar os microrganismos endofíticos e lhes favorecer o desenvolvimento. Provavelmente, a incubação dos explantes de cana-de-açúcar no escuro proporcionou um ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos. Mantell (1998) constatou uma ampla gama de microrganismos presentes na superfície de tecidos de espécies de inhame (*Dioscorea* sp.) cultivadas *in vitro* e observou que o crescimento bacteriano só se tornou aparente quando as culturas foram mantidas no escuro e estiveram sujeitas a temperaturas flutuantes. Ademais, condições de luminosidade influenciam diretamente a resposta embriogênica dos cultivos (Geetha & Padmanabhan, 2001; Ali et al., 2007).

Tabela 2- Índice de formação de embriões somáticos (IFE) em segmentos basais de folhas jovens não expandidas da variedade RB 872552 de cana-de-açúcar, após 40 dias de incubação em distintos meios indução de embriogênese somática direta (ESD).

Tratamentos de indução de ESD	IFE	IFE
	(Dados não transformados)	(Dados transformados $\sqrt{x+0,5}$)
TS- Snyman et al., (2006)	0	0 c
TD- Desai et al., (2004)	0	0 c
TG- Geetha et al., (2001)	0,416	0,947 b
TA- Ali et al., (2007)	0,816	1,139 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade (CV = 10,44%)

Nos tratamentos TG e TA confirma-se a eficiência do 2,4-D na indução de embriogênese somática, mas destaca-se que, em comparação com o TS, além da concentração 5 vezes maior, a atuação dessa auxina foi influenciada pela presença da citocinina (6-benzilaminopurina – BAP). Observou-se também que, quando dobrou a proporção auxina/citocinina, no tratamento TA, a resposta embriogênica foi maior do que no TG, conforme constatado pelo IFE. De acordo com KrishnaRaj & Vasil (1995), uma alta concentração de auxina exógena é necessária para manter a natureza embriogênica da maioria das monocotiledôneas. Os resultados descritos neste trabalho para a variedade RB872552 de cana-de-açúcar confirmam aqueles apresentados por Ali et al. (2007) na indução de ESD nas variedades CP-77.400 e BL-4, no Paquistão, incubando, em meio MS acrescido de 0,25 mg.L⁻¹ de BAP e 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D, em segmentos de folhas jovens não expandidas. Um dos possíveis alvos de ação de auxina é a indução da expressão do gene *cdc2* que codifica a quinase, proteína chave reguladora do ciclo celular. A auxina sozinha pode resultar no acúmulo dessa proteína em grandes quantidades, mas para a ativação da quinase, a presença de citocinina é necessária (Pasternak et al., 2000). Almeida & Almeida (2006) também observaram a formação de embriões somáticos em pupunha pela via direta, através do balanço auxina/citocinina.

Além da combinação de fitoreguladores, a concentração de sacarose é outro fator que

pode ter influenciado no sucesso obtido com o emprego da metodologia proposta por Ali et al (2007), o tratamento TA. A sacarose é a fonte de carboidratos mais utilizada na embriogênese somática. Em geral, a obtenção de embriões em mono e dicotiledôneas se dá pela adição de 3% desse dissacarídeo ao volume do meio de cultura. Variações na concentração desse açúcar afetam as condições osmóticas e o metabolismo da planta *in vitro*, influenciando nos processos de iniciação e de diferenciação dos embriões (Pereira et al., 2003; Matsumoto et al., 2004; Mengarda et al., 2009). Também já foi relatado que a concentração de sacarose pode influenciar diretamente a absorção de BAP (Charriere & Hahne, 1998). Isso poderia explicar a maior competência embriogênica expressa pelos explantes do tratamento TA, incubados em meio MS com menor concentração de BAP ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) e maior teor de sacarose (3% p/v), em comparação com aqueles explantes submetidos ao TG, com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e 2% de sacarose no meio de cultura.

Quinze dias após a transferência dos embriões para meio MS sem reguladores de crescimento surgiram regiões clorofiladas e teve início a formação de primórdios foliares (Figura 2A e 2B), antecedida por oxidação do tecido. Aos 60 dias em meio de diferenciação, plantas completas foram regeneradas (Figura 2C) e formaram perfilhos. Alguns embriões oxidaram e morreram enquanto outros apenas tornaram-se clorofilados, mas não se diferenciaram. De 25 explantes cultivados no tratamento TG que formaram embriões, 19 foram transferidos para o meio de conversão e foram regeneradas 47 plantas. No tratamento TA, dos 49 explantes que apresentaram competência embriogênica, 41 foram subcultivados em meio de conversão e foram regeneradas 254 plantas. A eficiência embriogênica (E_{emb}) foi de 2,47 para o tratamento TG e de 6,19 para o TA, comprovando a maior eficácia da metodologia descrita por Ali et al., (2007) com a qual obteve-se, aproximadamente, o triplo de plantas em relação à metodologia de Geetha & Padmanabhan (2001).

Entre as plantas regeneradas no tratamento TA, 1,57% apresentaram folhas variegadas (Figura 2D). Essas plantas tornaram-se completamente aclorofiladas e formaram perfilhos com as mesmas características indicando, possivelmente, a ocorrência de variação somaclonal. Segundo Taiz & Zeiger (2004) esses setores brancos ou amarelos em folhas são produzidos por células contendo genes defeituosos para a síntese de clorofila que são provavelmente induzidos pela exposição a agentes químicos, neste caso, a auxina 2,4-D. O desenvolvimento de embriões somáticos pela via direta (ESD) e/ou o uso de explantes jovens em combinação com o reduzido tempo de cultivo normalmente limitam a ocorrência de variações somaclonais (Gaj, 2004), entretanto, variantes somaclonais podem ocorrer em diversos tipos de cultivo *in vitro*, a despeito da via de regeneração das plantas (Duncan, 1997). Análises com marcadores moleculares poderiam confirmar a natureza genética ou epigenética do fenômeno relatado.

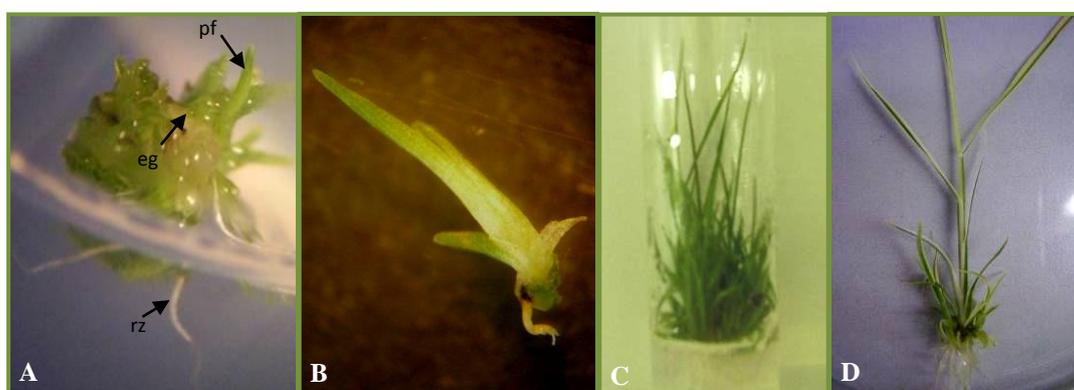


Figura 2- Embriogênese somática direta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar: (A) início da diferenciação de embriões em plantas após 20 dias em meio de conversão: eg = embrião somático globular, pf = primórdio foliar, rz = raiz; (B) fase inicial de desenvolvimento de uma planta a partir de embrião somático após 30 dias em meio de conversão; (C) plantas regeneradas *in vitro* após 60 dias de supressão do 2,4-D e do BAP do meio MS; (D) planta regenerada apresentando variegação, possivelmente decorrente de variação somaclonal.

Os resultados demonstram a viabilidade da utilização da embriogênese somática direta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar, com a conversão de embriões em plantas num período de 90 a 100 dias após a inoculação dos explantes *in vitro*.

As plantas regeneradas a partir de embriões somáticos foram mantidas em meio MS, perfilharam e após 30 dias apresentaram taxa de multiplicação de 1:1,68, sem necessidade de indução de enraizamento. Uma melhor taxa de multiplicação pode ser obtida com a transferência de grupos (*clusters*) de plantas para sistema de biorreator de imersão temporária (BIT). Esse teste foi realizado e os dados são ainda preliminares. Observou-se que um biorreator de imersão temporária (Figura 3) aberto após 30 dias de cultivo com plantas provenientes dos tratamentos de ESD, apresentou a formação de 84 plantas a partir de 32 plantas incubadas (taxa de multiplicação de aproximadamente 1:2,6). Destas 84 plantas, 12 (14%) tinham até 1,5cm (da base da planta até a ponta da folha de maior comprimento - geralmente a segunda mais jovem), 32 plantas (38%) estavam com 2-4 cm e 40 plantas (48%) com 5-10cm. O aspecto geral e o bom desenvolvimento (tamanho, coloração, enraizamento) dessas mudas em BIT é muito positivo e sugere a possibilidade de ampliar e ajustar uma metodologia de indução de ESD e multiplicação em BIT. A técnica também necessita ser ajustada para outras variedades que apresentem interesse para a agroindústria canavieira.



Figura 3- Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB872552 após 30 dias de cultivo em biorreatores de imersão temporária (BIT). As plantas são provenientes de embriões somáticos formados por via direta em meio MS com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e convertidos em meio MS sem reguladores de crescimento.

- *Atividade enzimática em tecidos embriogênicos (EE) e não embriogênicos (NE):*

A morfogênese vegetal é decorrente dos processos de divisão e diferenciação celular organizada, os quais dependem de sinais que desencadeiam processos específicos de síntese e, como consequência, acarretam alterações bioquímicas e metabólicas diversas. Algumas alterações bioquímicas têm sido indicadas para discriminar tecidos embriogênicos e não embriogênicos (Nieves et al., 2003), além de também revelar diferenças entre as culturas organogênicas e embriogênicas e as que possuem ou não potencial de regeneração (Laukkanen et al., 1999; Bonfill et al., 2003; Lozovaya et al., 2000). Embora o mecanismo molecular estimulatório não esteja elucidado, vários fatores de estresse induzem uma reação comum nas células somáticas que se manifesta por meio da desdiferenciação e rediferenciação em embriões somáticos (Gaj, 2004). No cultivo *in vitro* o suprimento incomum de reguladores de crescimento (alta disponibilidade de auxinas e/ou citocininas) e a acumulação de substâncias tóxicas (Kozai et al., 1997; Franck et al., 2001; Gaspar et al., 2002) estão entre os fatores indutores de estresse que podem levar à geração de espécies reativas de oxigênio e ao desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes e pré-oxidantes (ROS). Segundo Mittler (2002), as células vegetais possuem sistemas bem desenvolvidos para regular o nível das ROS, e a concentração dessas moléculas quimicamente ativas pode sofrer alterações pela ação de enzimas antioxidantes, que são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse.

A atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidativo diferiu significativamente entre os explantes com aspecto embriogênico (EE) e não embriogênico (NE) da variedade RB 872552 (Figura 4A e B).

A atividade da polifenoloxidase (PPO) foi bem menor no tecido embriogênico do que no não embriogênico (Figura 4C), sugerindo maior presença de compostos fenólicos nos explantes que não formaram embriões. A PPO catalisa a hidroxilação e a degradação

oxidativa de compostos fenólicos (Campos et al., 2004) os quais, além do papel estrutural na parede celular, exercem uma função protetora contra a ação das ROS (Ali et al., 2006). Lemos (2006) observou que a atividade máxima da PPO estava relacionada com a presença de compostos fenólicos livres e, ao ocorrer uma lesão no tecido vegetal, a PPO inicia a oxidação destes compostos. O aumento da atividade da PPO nas primeiras quatro semanas de cultivo *in vitro* favorece a oxidação dos tecidos e a subsequente perda de capacidade morfogênica e morte celular (Tang & Newton, 2004). Dessa forma, pode-se perceber que a elevada atividade de PPO nos explantes não embriogênicos indica um elevado nível de estresse oxidativo, o que pode ter impedido a formação de embriões. Como discutido anteriormente, o estresse pode provocar a desdiferenciação e rediferenciação de células somáticas com a formação de embriões. A ocorrência do estresse levaria as células a mudar sua rota morfogênica e se diferenciar (Fehér et al., 2003), mas se a severidade do estresse supera a capacidade de compensar os danos pode ocorrer perda total da totipotência (Bray et al., 2000).

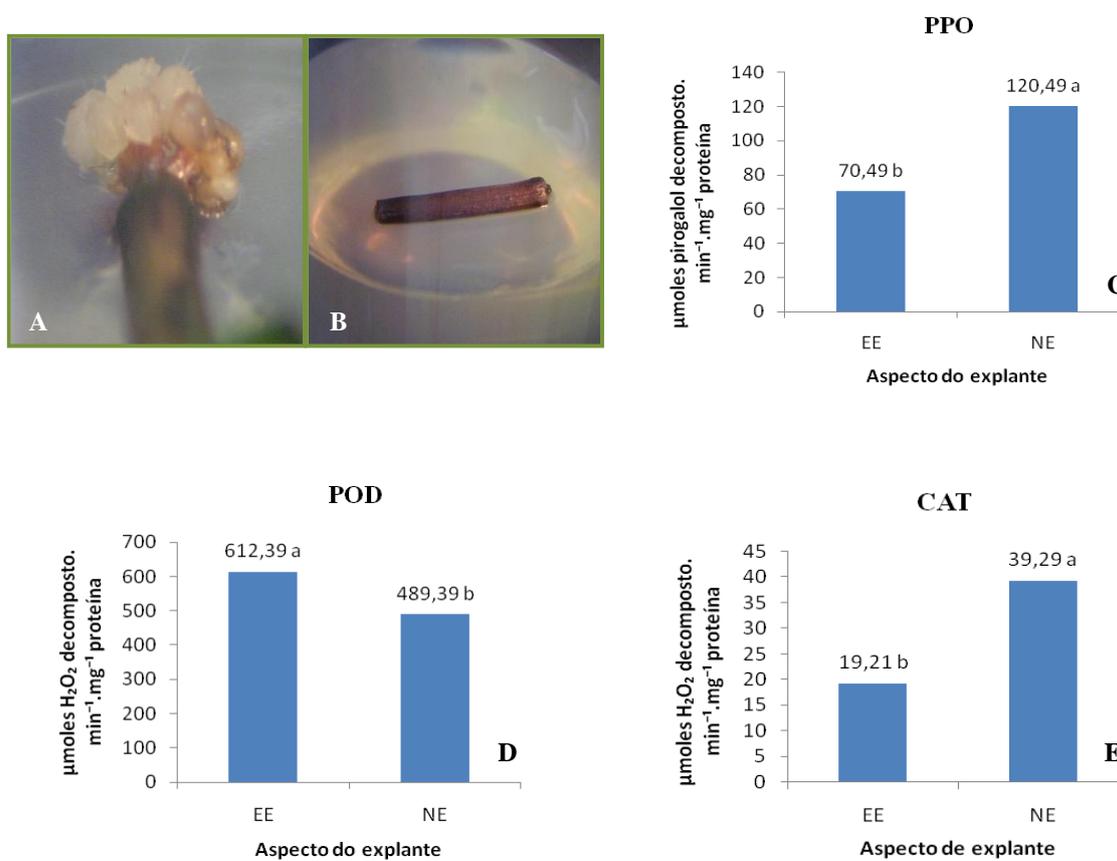


Figura 4- Determinação da atividade de enzimas antioxidantes na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar, após 40 dias de indução da ESD; (A) explante com aspecto embriogênico; (B) explante com aspecto não embriogênico; (C) atividade da PPO em explantes embriogênicos (EE) e não embriogênicos (NE); (D) atividade da POD em EE e NE; (E) atividade da CAT em EE e NE.

Quanto à atividade da peroxidase (POD), foi detectado um incremento em tecidos embriogênicos (Figura 4D). El Hadrami & Baaziz (1995) também observaram que em tâmara (*Phoenix dactylifera* L.), a embriogênese somática foi caracterizada por um aumento na atividade da POD. A ativação da POD juntamente com a superóxido dismutase (SOD) também foi detectada, por Ganesan & Jayabalan (2004), nos calos de *Gossypium hirsutum* L. que formaram maior quantidade de embriões somáticos. A POD está relacionada com os processos de crescimento e diferenciação celular, bem como com as mudanças morfológicas em resposta a estresses físico, químico e biológico. O aumento da atividade das peroxidases em plantas submetidas a condições estressantes pode ser fator determinante

da capacidade de adaptação dessas plantas, podendo a atividade da POD ser identificada como um marcador bioquímico de estresse (Piza et al., 2003). No estudo de possíveis marcadores para a embriogênese somática em *Eurycoma longifolia*, Hussein et al. (2006) verificaram que a atividade específica da POD foi geralmente maior nos calos embriogênicos do que nos calos não embriogênicos. A capacidade de regeneração é um fenômeno complexo que é regulado por vários fatores, entre os quais a atividade de enzimas como a peroxidase e a polifenoloxidase que podem ter efeitos indiretos sobre o processo de diferenciação celular (Laukkanen et al., 1999). O catabolismo das auxinas é reconhecidamente catalizado pela POD, de forma que um aumento na atividade dessa enzima corresponde a um menor teor de auxinas (Ros Barcelo & Munoz, 1992). A supressão ou diminuição da concentração dos reguladores de crescimento, em especial as auxinas, é um passo preponderante na etapa de conversão morfogênica (Willadino et al., 1996; Kevers et al., 2002; Desai et al., 2006). Por outro lado, os polifenóis são inibidores da ação da POD no catabolismo auxínico (Lee et al., 1980) e a atividade da PPO é essencial para assegurar a ação da POD na regulação do nível endógeno das auxinas (Rajeswari & Paliwal, 2008) que interferem diretamente na diferenciação celular, com a consequente conversão de embriões somáticos em plantas.

A atividade da catalase (CAT), entretanto, foi menor nos explantes embriogênicos em relação aos não embriogênicos (Figura 4E). Blazquez et al. (2009) identificaram reduzida atividade da CAT nos estágios iniciais da embriogênese em *Crocus sativus* L. induzida com 2,4-D e BAP. Esse declínio na CAT também precedeu o surgimento de embriões somáticos em *Lycium barbarum* L. (Cui et al., 1999) e *Gladiolus hybridus* (Grupta & Datta, 2004).

A catalase converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado sob condições de estresse, em água e oxigênio estável (Mallick & Mohn, 2000). De acordo com Arora et al. (2002), o nível da catalase presente nos peroxissomos é ineficiente na remoção de baixas concentrações de H_2O_2 , sendo essas moléculas reduzidas no ciclo do ascorbato-glutationa,

sob a ação da peroxidase do ascorbato (APX) e outras enzimas do ciclo. Portanto, a atuação da CAT torna-se mais importante quando a concentração de H_2O_2 está em níveis mais elevados, característicos de condições de estresse severo.

Com base nos resultados obtidos, pode-se ressaltar a importância de estudos relacionados à embriogênese somática, especialmente na compreensão dos estímulos e condições ideais à indução, bem como do conhecimento sobre os mecanismos pelos quais os reguladores de crescimento e os fatores de estresse estão envolvidos na regulação e no controle deste processo, visando aumentar a eficiência morfogênica para a produção de plantas superiores em larga escala e a regeneração de plantas transformadas geneticamente.

- *Análise histológica por microscopia óptica:*

Através da análise histológica observou-se a presença de embriões somáticos no início de sua formação (Figura 5A) e em estágio globular (Figura 5B), sem protoderme e procâmbio definidos. As células presentes nessas estruturas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa. Essas características incluem tamanho reduzido, conteúdo citoplasmático denso e núcleos grandes e bem corados (Vasil, 1982; Guerra et al., 1999; Mathew & Philip, 2003).

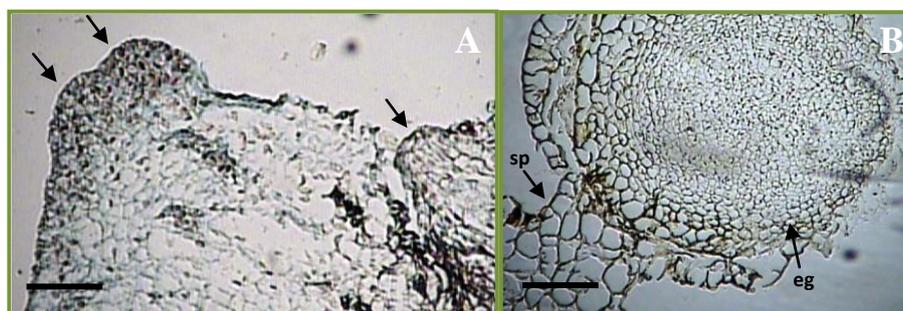


Figura 5- Cortes histológicos de explantes embriogênicos de cana-de-açúcar da variedade RB 872552 cultivados em meio MS acrescido de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP durante 40 dias; (A) início da formação de embriões somáticos (setas); (B) embrião somático em estágio globular, com células pequenas e núcleos proeminentes: eg= embrião globular, sp= suspensor (Barra=1mm).

Experimento 2: Indução de embriogênese somática indireta (ESI)

Todos os explantes apresentaram oxidação cinco dias após a inoculação em meios de indução de embriogênese somática indireta (ESI), independente do tratamento. Apesar disso, a formação de calos iniciou-se a partir do 8º dia de cultivo nos tratamentos com maior concentração de 2,4-D (D8F10 e D8F100) e, posteriormente, nos tratamentos que continham 2,4-D. Apesar da competência embriogênica de células somáticas cultivadas *in vitro* poder ser estimulada por vários fatores reconhecidos como agentes estressantes (Choi et al., 1998; Akula et al., 2000; Ikeda-Iwai et al., 2003; Pasternak et al., 2002; Lee et al., 2001; Kumria et al., 2003), na ausência da auxina não houve formação de calos, mesmo quando a concentração de Fe-EDTA foi aumentada, evidenciando que o excesso de ferro por si só não foi suficiente para induzir calogênese na variedade de cana-de-açúcar estudada. De acordo com Steinmacher (2005), análogos de auxina desempenham papel ambíguo na indução à embriogênese somática, induzindo a divisão celular e atuando como uma fonte de estresse. O 2,4-D, entretanto, é o agente indutor mais utilizado na via de embriogênese somática, pois induz genes responsáveis pela sinalização desse processo morfogênico (Campos et al., 2009). Essa auxina desencadeia importante papel na indução de calos embriogênicos. Para Ho & Vasil (1983), de todos os reguladores de crescimento, o 2,4-D tem se mostrado o mais eficiente para a indução de calos e formação de embriões somáticos em cultura de células e tecidos de gramíneas, incluindo a cana-de-açúcar.

Tabela 3- Índice de formação de calos (IFC) em segmentos basais de folhas jovens não expandidas da variedade RB 872552 de cana-de-açúcar, após 4 semanas de incubação em distintos meios indução de embriogênese somática indireta (ESI).

Tratamentos de indução de ESI	IFC	IFC
	(Dados não transformados)	(Dados transformados $\sqrt{x+0,5}$)
T1- D0F10	0	0 c
T2- D0F100	0	0 c
T3- D2F10	0,130	0,789 b
T4- D2F100	0,050	0,739 b
T5- D4F10	0,160	0,807 b
T6- D4F100	0,070	0,752 b
T7- D8F10	0,400	0,940 a
T8- D8F100	0,350	0,910 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade (CV = 12,51%)

A média de formação de calos (Tabela 3) foi superior nos explantes submetidos aos tratamentos D8F10 e D8F100 (0,400 e 0,350). Os calos apresentaram-se com coloração bege, marrom-claro ou marrom-escuro e, quanto à textura, eram friáveis ou mucilaginosos. Nesse caso, a utilização de uma maior concentração de ferro no meio de cultura provocou uma diminuição na formação de calos, além de textura mucilaginosa nos mesmos que, segundo Cidade et al. (2006), caracteriza um calo não-morfogênico em cana-de-açúcar.

Passadas oito semanas de incubação nos meios de indução, apenas um explante do tratamento D8F10 apresentou diferenciação do calo com formação de embriões somáticos (Figura 6A). Todo o material vegetal foi transferido para tubos de ensaio contendo meio MS sem adição de fitoreguladores. As diferenças observadas na proliferação de calos nos explantes em um mesmo tratamento apontam para a variabilidade na sensibilidade aos fitoreguladores e/ou a diferenças no teor endógeno de hormônios. A afinidade e a concentração de receptores na superfície do tecido alvo determinam o tipo de resposta morfogênica (Flores et al., 2006; Ali et al., 2008).

Sessenta dias após a transferência do material vegetal para tubos de ensaio contendo meio MS sem adição de fitoreguladores, do único explante que expressou competência embriogênica, proveniente do tratamento D8F10 (8 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 10 mL.L⁻¹ de Fe-EDTA), foram regeneradas 157 plantas (Figura 6B). Alterações fisiológicas e na expressão gênica têm sido induzidas em células submetidas a tratamentos com altas concentrações de 2,4-D, evidenciando seu papel como um fator de estresse capaz de alterar o padrão morfogênico das células cultivadas *in vitro* (Féher et al., 2003). Féher et al. (2003) constataram que células embriogênicas são induzidas por altas concentrações de 2,4-D ou baixas concentrações dessa auxina em conjunto com alguma fonte de estresse oxidativo como ferro, cobre e o herbicida paraquat (metilviologênio). Entretanto, quando a concentração de 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D foi aplicada em associação com o excesso de Fe-EDTA (100 mL.L⁻¹) os calos não diferenciaram. A severidade do estresse induzido com aplicação do tratamento D8F100 (8 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 100 mL.L⁻¹ de Fe-EDTA) pode ter ultrapassado a capacidade de expressão morfogênica dos explantes submetidos a esse tratamento. O fracasso em compensar um estresse severo pode resultar em variação somaclonal ou mutação (Cassells et al., 1999; Cassells & Cury, 2001), perda total da totipotência morfogênica e, finalmente, morte da planta ou da célula, diretamente (Bray et al., 2000).

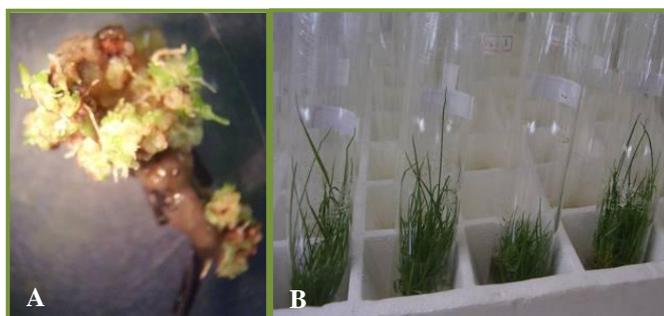


Figura 6- Embriogênese somática indireta na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar: (A) calo embriogênico formado a partir de explante inoculado em meio MS com 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 10 mL.L⁻¹ de Fe-EDTA (tratamento D8F10) após 8 semanas; (B) plantas regeneradas após 60 dias em meio de conversão.

Almeida & Almeida (2006) afirmam que, algumas vezes, para que a capacidade embriogênica de um tecido seja ativada torna-se necessária a aplicação de uma elevada quantidade de auxina. Kitamiya et al. (2000) registraram a indução da embriogênese somática, em hipocótilos de *Daucus carota*, por choque auxínico, por meio da aplicação de 450 μM de 2,4-D durante o período de 2 horas. A formação de embriões somáticos a partir de calos formados em segmentos basais de folhas jovens não expandidas cultivados em meio MS acrescido de 8 mg.L^{-1} de 2,4-D, na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar, parece ter sido induzida por estresse ocasionado por choque auxínico. Uma das hipóteses sobre o mecanismo envolvido na indução da embriogênese somática pelo estresse destaca a importância da interação entre auxinas e a sinalização do estresse, que resulta na aquisição da competência embriogênica da célula somática por meio da reprogramação celular manifestada em diferentes níveis (Fehér et al. 2003).

AGRADECIMENTOS

À FACEPE, pela concessão de bolsa de mestrado à primeira autora; à Biofábrica Governador Miguel Arraes do CETENE, pela doação das mudas matrizes; ao prof. José Carlos Dubeux e Talita Firemand, do Laboratório de Anatomia de Plantas Forrageiras da UFRPE, pela colaboração nas análises histológicas.

REFERÊNCIAS

- AKULA, A.; BECKER, D.; BATESON, M. High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plan recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. **Plant Cell Report**, v.19, p.1140-1145, 2000.
- ALI, A.; NAZ, S.; IQBAL, J. Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Pakistan Journal of Botany**, v.39, p.1961-1977, 2007.
- ALI, A.; NAZ, S.; SIDDIQUI, F.A.; IQBAL, J. Rapid clonal multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) through callogenesis and organogenesis. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.123-138, 2008.
- ALI, M.B.; SINGH, N.; SHOHAEL, A.M.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Phenolic metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. **Plant Science**, v.171, p.147-154, 2006.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V. Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration from pejobaye adult plant leaf primordia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.9, p.1449-1452, 2006.
- ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Low temperature and oxidative stress. **Current Science**, v.82, p.1227-1238, 2002.
- BERRS, L. S. Jr.; SIZER I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.133-140, 1952.
- BLAZQUEZ, S.; OLMOS, E.; HERNÁNDEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ, J.A.; PIQUERAS, A. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.).

Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.97, p.49-57, 2009.

BONFILL, M.; CUSIDO, R.M.; PALAZON, J.; CANUT, E.; PINOL, M.; MORALES, C. Relationship between peroxidase activity and organogenesis in *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.73, p.37-41, 2003.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1189-1197.

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

CAMPOS, J.M.S.; CALDERANO, C.A.; PEREIRA, A.V.; DAVIDE, L.C.; VICCINI, L.F.; SANTOS, M.O. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.1, p.38-44, 2009.

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

CASSELLS, A.C.; JOYCE, S.M.; CURY, R.F.; MCCARTHY, T.F. Detection of economically important variability in micropropagation. In: ALTMAN, A.; IZHAR, S.; ZIV, M. **Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999.

CHARRIERE, F.; HAHNE, G. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on in vitro cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. **Plant Science**, v.137, p.63-71, 1998.

CHOI, Y.E.; YANG, D.C.; CHOI, K.T. Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.52, p.177-181, 1998.

CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.3, p.385-391, 2006.

CUI, K.; XING, G.; LIU, X.; XING, G.; WANG, Y. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant science**, v.146, p.9-16, 1999.

DESAI, N.S.; JOSEPH, D.; SUPRASANNA P.; BAPAT V.A. Study of elemental variation during somatic embryogenesis in sugarcane using photon induced X-ray probe. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, v.252, p.299-302, 2006.

DESAI, N.S.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Current Science**, v.87, n.6, p.764-768, 2004.

DUNCAN, R.R. Tissue culture induced variation in crop improvement. In: SPARKS, D.L. **Advances in Agronomy**. New York: Academic Press, v.58, p.201-240, 1997.

EL HADRAMI, I.; BAAZIZ, M. Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L. **Biologia Plantarum**, v.37, p.197-203, 1995.

FATIBELHO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v.25, n.3, p.455-464, 2002.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; VASCONCELLOS, N.J.S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.89-95, 2006.

FRANCK, J.P.; ISAAC, I.; LAWRIE, D.D. Oxygen isotope effect in $\text{La}_{0.8}\text{Ca}_{0.2}\text{MnO}_{3+\delta}$ and its dependence on oxygen stoichiometry. **Physical Review Letters**, v.64, p.214-222, 2001.

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

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Rep**, v.23, p.181-187, 2004.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v.37, p.263-285, 2002.

GEETHA, S.; PADMANABHAN, D. Effect of hormones on direct somatic embryogenesis in sugarcane. **Sugar Tech**, v.3, p.120-121, 2001.

GEIJSKES, R.J.; WANG, L.; LAKSHMANAN, P.; MCKEON, M.G.; BERDING, N.; SWAIN, R.S.; ELLIOT, A.R.; CROF, C.P.L.; JACKSON, J.A.; SMITH, G.A. SmartSet™ seedlings: tissue cultured seed plants for the Australian sugar industry. **Sugar Cane International**, p.13-17, 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; **Cultura de tecidos e Transformação de Plantas**. Brasília: Embrapa-SP/CNPH, v.1, p.183-260, 1998.

GRUPTA, S.D.; DATTA, S. Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidant on plant regeneration. **Biologia Plantarum**, v.47, p.179-183, 2004.

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

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

HUSSEIN, S.; IBRAHIM, R.; KIONG, A.L.P. Potential biochemical markers for somatic embryos of *Eurycoma longifolia* Jack. **Journal of Plant Biology**, v.49, n.1, p.97-101, 2006.

IKEDA-IWAI, M.; UMEHARA, M.; SATOH, S.; KAMADA, H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.34, p.107-114, 2003.

JIMÉNEZ, V.M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p. 196-223, 2001.

JOHANSEN, D. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1940.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during pice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.

KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J. The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng* in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.70, p.181-188, 2002.

KITAMIYA, E.; SUZUKI, S.; SANO, T.; NAGATA, T. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. **Plant Cell Reports**, v.19, p.551-557, 2000.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, n.1, p.49-56, 1997.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. p.198.

KRISHNARAJ, S.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. In: THORPE, T.A. **In Vitro Embryogenesis in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.471-540, 1995.

KUMRIA, R.; SUNNCHAN, V.G.; DAS, D.K.; GUPTA, S.K.; REDDY, V.S.; BHATNAGAR, R.K.; LEELAVATHI, S. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. **Plant Cell Report**, v.21, p.635-639. 2003.

LAUKKANEN, H.; HAGGMAN, H.; SOPPELA, S.K.; HOHTOLA. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. **Physiologia Plantarum**, v.106, p.337-343, 1999.

LOZOVAYA, V.V.; GORSHKOVA, T.A.; RUMYANTSEVA, N.I.; ULANOV, N.V.; VALIEVA, A.I.; YABLOKOVA, E.V.; MEI, M.; WIDHOLM, J.M. Cell wall-bound phenolics in cells of maize (*Zea mays*, Gramineae) and buckwheat (*Fagopyrum tataricum*, Polygonaceae) with different plant regeneration abilities. **Plant Science**, v.152, p.79-85, 2000.

LEE, T.T.; STARRAT, A.N.; JEVNIKAR, J.J.; STOESSE, A. New phenolic inhibitors of the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. **Phytochemistry**, v.19, p.2277-2280, 1980.

LEE, E.K.; CHO, D.Y.; SOH, W.Y. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. **Plant Cell Report**, v.20, p.408-415, 2001.

LEMOS, S.D.C. Avaliação de eliciadores do metabolismo dos fenilpropanóides em *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). Porto Alegre, PUC. 85p. 2006.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response to alga cells. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.183-193, 2000.

MANTELL, S. H. Microbes intimately associated with tissue cell cultures of tropical *Dioscorea* yams. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.52, p.47-52, 1998.

MATHEW, M.M; PHILIP, V.J. Somatic embryogenesis *versus* zygotic embryogenesis in *Ensete superbum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72. p.267-275, 2003.

MATSUMOTO, K.; RAHARJO, S.H.T.; DHEKNEY, S.; MOON, P.A.; LITZ, R.E. Criopreservação e embriogênese somática de calos de *Dimocarpus longan*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.12, p.1261-1263, 2004.

MENGARDA, L.H.G.; PESCADOR, R.; CHU, E.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Efeito do frio sobre os carboidratos solúveis em culturas embriogênicas de *Acca sellowiana* O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.32, n.2, p.307-317, 2009.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NIEVES, N.; SEGURA-NETO, M.; BLANCO, M.A.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J.L.; CASTILLO, R. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.39, p.343-345, 2003.

PASTERNAK, T.; MISKOLCZI, P.; AYAYDIN, F.; MÉSZÁROS, T.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Growth Regulation**, v.32, p.129-141, 2000.

PASTERNAK, T.P.; AYAYDIN, E.P.F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; ONCKELEN, H.A.V.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, v.129, p.1807-1819, 2002.

PEREIRA, A.R.; PASQUAL, M. CHAGAS, E.A.; FRÁGUAS, C.B.; DUTRA, L.F. Indução de embriões somáticos globulares e cordiformes de cafeeiro por BAP e sacarose. **Scientia Agraria**, v.4, n.1-2, p.77-80, 2003.

PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.4, p.361-366, 2003.

RAJESWARI, V.; PALIWAL, K. Peroxidase and catalase changes during in vitro adventitious shoot organogenesis from hypocotyls of *Albizia odoratissima* L.f. (Benth). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, p.825-832, 2008.

ROS BARCELO, A.; MUNOZ, R. Peroxidases: their role in the control of plant cell growth. In: PENEL, C.; GASPARD, T.H.; GREPPIN, H. **Plant peroxidases. Topics and detailed literature on molecular, biochemical and physiological aspects**. Switzerland: University of Geneva, p.71-89, 1992.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p.71-78, 2002.

SNYMAN, S.J.; MEYER, G.M.; RICHARDS, J.M.; HARICHARAN, N.; RAMGAREEB, S.; HUCKETT, B.I. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Reports**, v.25, p.1016-1023, 2006.

STEINMACHER, D.A. Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha. Florianópolis: UFSC, 2005. 146p. (Mestrado).

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

TANG, W.; NEWTON, R.J. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). **Plant Science**, v.167, p.621-628, 2004.

VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant Tissue Culture**. Tokyo: Ed. Maruzen, 1982. p.101-103.

WILLADINO, L. CAMARA, T.R. SANTOS, M.A.; TORNÉ J.M. Polyamines and free aminoacids in NaCl embryogenic callus from sensitive and resistant maize cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v.174, p.179-185, 1996.

CONCLUSÕES GERAIS

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

- A embriogênese somática na variedade RB 872552 de cana-de-açúcar pode ser obtida: pela via morfogênica direta através da utilização do balanço auxina/citocinina nas concentrações de 3 mg.L^{-1} de 2,4-D e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP ou 3 mg.L^{-1} de 2,4-D e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP em meio MS, e manutenção do cultivo sob fotoperíodo de 16 horas de luz; e pela via morfogênica indireta, mediante a adição de 8 mg.L^{-1} de 2,4-D em meio MS.
- O aumento da atividade da peroxidase e o decréscimo na atividade da catalase e da polifenoloxidase em tecidos embriogênicos confirmam a regulação do estresse oxidativo na indução da embriogênese somática direta na variedade RB872552 de cana-de-açúcar.

ANEXO

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA SCIENTIA AGRICOLA

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

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

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

INSTRUÇÕES GERAIS

Originais: uma via e um CD com texto e ilustrações

Língua: Inglês

Processador de texto: Word for Windows

Espaçamento do texto: duplo, margens laterais de três centímetros

Papel: formato A4, com linhas numeradas

Fonte: Times New Roman, tamanho 12

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

Apresentação da página de rosto

- a. título do artigo (máximo de 15 palavras)
- b. nome(s) do(s) autor(es), indicar com asterisco o autor correspondente
- c. filiação científica do(s) autor(es), mencionando Instituição/ Departamento/ Seção
- d. e-mail do autor correspondente

Apresentação da estrutura do artigo

Não colocar nomes dos autores.

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

Citações do texto

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

Referências bibliográficas

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

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

Artigos de periódicos

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

Publicados online

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

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=0103-901620030003&lng=pt&nrm=iso>. Accessed 04 Sept. 2003.

Livros

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

Capítulos de livros

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

Eventos (considerados em parte)

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

Teses e Dissertações

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

Citação de resumo

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

Tabelas e figuras

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

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

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

Informações Complementares

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

ENCAMINHAMENTO DE ARTIGOS

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

Encaminhar para USP/ ESALQ/ SCIENTIA AGRICOLA, Prof. Luís Reynaldo F. Alleoni - Editor Chefe, no endereço: Av. Pádua Dias, 11; Caixa Postal 9; 13418-900 - Piracicaba, SP – Brasil.