AMANDA FERREIRA MACEDO

**METABOLISMO DE POLIAMINAS DURANTE A EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**São Paulo
2010**

AMANDA FERREIRA MACEDO

**METABOLISMO DE POLIAMINAS DURANTE A EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira

**São Paulo
2010**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Macedo, Amanda Ferreira.

Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de
cana-de-açúcar / Amanda Ferreira Macedo. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Vanildo Silveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Fisiologia vegetal.

Versão do título para o inglês: Polyamines metabolism during somatic
embryogenesis in sugarcane.

Descritores: 1. *Saccharum ssp* 2. Carvão ativado 3. Agentes de
maturação 4. Embriogênese somática 5. Competência embriogênica
6. Poliaminas I. Silveira, Vanildo II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB018/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Amanda Ferreira Macedo.

Título da Dissertação: Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar.

Orientador(a): Vanildo Silveira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedico este trabalho aos meus pais, Edmilson e Judirene, por todo o apoio, e principalmente, ao meu futuro marido Rodrigo por todo companheirismo e incentivo. Não tenho palavras que fossam fielmente retratar minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao prof. Dr. Vanildo Silveira pela orientação, confiança e amizade dispensadas durante todo o período de meu Mestrado.

À profa. Eny I. S. Floh pela co-orientação, a qual deixou de porta abertas o Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL, Depto. Botânica, IB/USP), onde pude desenvolver meu trabalho.

À profa. Dra. Claudete Santa Catarina pela amizade e por toda ajuda, ajuda esta não apenas dedicada a elaboração deste trabalho, mas a todos os momentos de dificuldades.

Ao Rodrigo, por estar presente em minha vida. Por me ajudar em todos os momentos, desde a execução dos experimentos até a elaboração desta dissertação.

À minha família, meus pais, Edmilson e Judirene, e aos meus irmãos, Igor e Danilo, pela confiança e pelo orgulho que demonstram sentir.

À minha futura nova família, Nelson, Solange e Victor por sempre estarem prontos a ajudar.

Às minhas amigas Denize Mós, Lilian Rose e Micheli Nadini por compreenderem minhas ausências, e sempre me incentivarem a dar o melhor de mim.

À todos do laboratório BIOCEL: Ana Lúcia, André, Carmem, Fernanda, Júlia, Léo Dias, Léo Jo, Tiago, Yve pelo convívio e ajudas diárias.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Adriana Yepes, Alessandra, Aline, Lina e Suzi pelo apoio na realização deste trabalho.

À Aline de Vita, Tatiana Chiquieri, Ludmila Fim e Maria Fernanda do Laboratório de Biotecnologia da UENF por toda ajuda, e pelas ótimas dicas dadas para a execução deste trabalho.

À FAPESP, FAPERJ, CAPES e CNPq que através dos recursos financeiros aprovados pelo grupo de pesquisa viabilizaram este projeto.

À Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização deste trabalho e por oferecer o ensino gratuito e de qualidade.

“Botas... as botas apertadas são uma das maiores venturas da terra, porque, fazendo doer os pés, dão azo ao prazer de as descalçar.”

Machado de Assis

RESUMO

MACEDO, A.F. **Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A embriogênese somática (ES) apresenta um alto potencial no fornecimento de material para transformação genética e regeneração de plantas transgênicas. O metabolismo de poliaminas (PAs) está diretamente correlacionado à competência embriogenética e maturação de culturas embriogênicas. O estudo do metabolismo destas biomoléculas envolvendo parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares, pode gerar uma melhor compreensão do processo de maturação, e criar estratégias importantes para otimização da ES em cana-de-açúcar. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar a relação entre os conteúdos endógenos de PAs, associados à determinação da competência embriogenética e a maturação progressiva de embriões somáticos em cana-de-açúcar. Calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) da variedade SP-803280, foram submetidos a diferentes tratamentos de maturação: (I) no primeiro experimento foram utilizados diferentes agentes de maturação adicionados ao meio MS, como ácido abscísico (ABA-20 μ M), polietilenoglicol (PEG-3350-3%), 6-benzilaminopurina (BAP-1 μ M), ABA+PEG (20 μ M + 3%) e sem a suplementação de agentes de maturação. Como controle foi utilizado o meio de cultura de multiplicação (MS suplementado com 2,4-D (10 μ M)); e (II) foi montado um segundo experimento com diferentes concentrações de carvão ativado (CA - 0,75 g.L⁻¹; 1,5 g.L⁻¹; 3,0 g.L⁻¹) adicionados ao meio MS. Como controle foi utilizado o meio MS sem adição de CA ou regulador de crescimento. Inicialmente, em ambos os experimentos, todas as culturas foram mantidas em estufa de crescimento (tipo BOD) com temperatura de 25 $\pm$ 1 °C, no escuro por sete dias e, posteriormente, as placas foram transferidas para BOD com fotoperíodo de 16 h de luz, a 25 $\pm$ 1 °C, por 21 dias. Observou-se que as culturas NE submetidas aos dois experimentos de maturação, não foram capazes de promover a diferenciação de embriões somáticos, devido principalmente, ao alto grau de oxidação das culturas. No primeiro experimento, foi

observado que os calos E apresentaram conteúdos endógenos de PAs totais superiores aos calos NE, entretanto, no controle não foram observadas diferenças expressivas entre os dois tipos de calos. No experimento com diferentes concentrações de CA, observou-se uma evolução embriogenética em calos E, resultando na maturação das massas pró-embriogênicas em embriões somáticos, e posterior desenvolvimento de plântulas somáticas. Os tratamentos 1E e 2E (0,75 e 1,5 g.L⁻¹ de CA, respectivamente) foram os que apresentaram as maiores frequências de formação de embriões somáticos ao final do experimento. Foi observado que o CA afetou consideravelmente os níveis endógenos de PAs livres totais nos calos E e NE quando comparadas ao controle. Neste experimento, em geral, os calos NE de cana-de-açúcar apresentaram menores conteúdos de PAs livres, quando comparados com os calos E, em todos os tratamentos com CA. A partir dos resultados obtidos com a suplementação do meio MS com CA (1.5 g.L⁻¹), podemos associar a embriogênese somática em calos de cana-de-açúcar ao aumento do conteúdo endógeno de Spd e Spm, principalmente Spd, acompanhado pela redução nos níveis de Put. Assim, este trabalho mostrou que a maturação de embriões somáticos de cana-de-açúcar pode estar relacionada com a biossíntese de PAs, indicando a importância do metabolismo destes biomoléculas na competência de culturas embriogênicas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum* ssp.; carvão ativado; agentes de maturação; embriogênese somática; competência embriogênica; poliaminas.

ABSTRACT

MACEDO, A.F. **Polyamine metabolism during the somatic embryogenesis in sugarcane.** 85 p. Master thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The somatic embryogenesis (ES) presents a high potential as supply of material for regeneration and genetic transformation of transgenic plants. The metabolism of polyamines (PAs) is directly related to embryogenetic competence of cultures. The study of metabolism of these biomolecules involving physiological, biochemical and molecular parameters, could improve the understanding of somatic embryo maturation process, and allowed some insights for the optimization of ES in sugarcane. Thus, the objective of this work was to study the relation between endogenous PAs contents, related with the determination of embryogenetic competence and the progressive maturation of somatic embryos. Embryogenic (E) and non-embryogenic (NE) calli from SP-803280 variety, were submitted to different maturation treatments: (I) in the first assay were used some agents of maturation added to MS medium, as abscisic acid (ABA-20 μ M), polyethylene glycol (PEG-3350-3%), 6-benzylaminopurine (BAP-1 μ M), ABA+PEG (20 μ M + 3%) and MS medium without supplementation of agents of maturation. As control it was used the culture medium of multiplication (MS supplemented with 2,4-D (10 μ M)); and (II) was prepared a second experiment with different concentrations of activated charcoal (CA – 0.75 g.L⁻¹; 1.5 g.L⁻¹; 3.0 g.L⁻¹) added to MS medium. As control was used MS medium without CA or growing regulator. Initially, in both experiments, all the cultures were maintained in a plant growth chamber with temperature of 25 $\pm$ 1 °C, in the dark for 7 days and, afterward, the plates were transferred photoperiod of 16 h in the light, in 25 $\pm$ 1 °C, for 21 days. It was found that the NE cultures submitted to both experiments of maturation, were not able to promote the somatic embryos differentiation, due mainly, culture turned browning. In the first experiment, was found that the E callus presented endogenous contents of total PAs higher than NE callus, however, in the control were not found considerable differences between two callus types. In experiment with different concentrations of CA, was possible to observe an embryogenetic evolution in E callus, resulting in the maturation of

somatic embryos followed by the development of somatic seedlings. The treatments 1E e 2E (0.75 e 1.5 g.L⁻¹ de CA, respectively) showed the major frequencies of somatic embryos formation at the end of experiment. It was found that the CA affected considerably the endogenous levels of total free PAs in the E and NE callus when compared to the control. In this experiment, in general, the NE callus from sugarcane presented lower contents of free PAs, if compared to E callus, in every treatments with CA. Since this, the supplementation of MS medium with CA (1.5 g.L⁻¹), we can associate the somatic embryogenesis in callus from sugarcane to the increase of endogenous content of Spd and Spm, mainly Spd, accompanied for a reduction in Put levels. Thus, this work showed that the somatic embryos maturation from sugarcane can be related with the PAs biosynthesis, indicating the importance of metabolism of these biomolecules in the competence of embryogenic cultures from sugarcane.

Key word: *Saccharum* ssp.; activated charcoal; agents of maturation; somatic embryogenesis; embryogenic competence; polyamine.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1 – Modulação da embriogênese somática.....	25
Figura 2 – Tipos morfológicos de calos de cana-de-açúcar	27
Figura 3 – Esquema da biossíntese de poliaminas em plantas	32
Figura 4 – Esquema de indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar	42
Figura 5 – Análise morfológica da capacidade embriogênica em calos de cana-de-açúcar.....	42
Figura 6 - Morfologia de calos não-embriogênicos (NE) submetidos aos tratamentos de maturação	43
Figura 7 – Morfologia de calos embriogênicos (E) submetidos aos tratamentos de maturação.....	44
Figura 8 – Cortes histológicos em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar	45
Figura 9 – Morfologia de calos embriogênicos (E) submetidos aos tratamentos de maturação na presença de carvão ativado (CA).....	47
Figura 10 – Variação de matéria fresca (MF) de calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) submetidos aos tratamentos de maturação	48
Figura 11 – Variação de matéria fresca (MF) de calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) para determinação do efeito do carvão ativado (CA) na maturação.....	50
Figura 12 – Resposta morfológica de calos embriogênicos (E) submetidos aos tratamentos de maturação na presença de diferentes concentrações de carvão ativado (CA).....	52
Figura 13 – Resposta morfológica de calos não-embriogênicos (NE) submetidos aos tratamentos de maturação na presença de diferentes concentrações de carvão ativado (CA).....	53
Tabela 1 – Efeito do carvão ativado (CA) no número de embriões somáticos e/ou plântulas somáticas (em 100 mg de MF) formados nos diferentes tratamentos durante a maturação de calos embriogênicos (E) de cana-de-açúcar.....	54

Figura 14 – Diferentes fases do desenvolvimento embrionário durante a embriogênese somática (ES) de cana-de-açúcar, durante a maturação em meio MS suplementado com 1.5 g.L^{-1} de carvão ativado (CA)	55
Figura 15 – Efeito dos agentes de maturação no conteúdo de poliaminas (PAs) totais (soma de Put, Spd e Spm) em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar.....	58
Figura 16 – Efeito de carvão ativado (CA) no conteúdo de poliaminas (PAs) livres totais em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar durante a maturação	60
Figura 17 – Efeito dos agentes de maturação no conteúdo de poliaminas (PAs) livres em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar.....	62
Figura 18 – Efeito do carvão ativado (CA) no conteúdo geral dos níveis de poliaminas PAs) livres (Put; Spd; Spm) em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar durante a maturação.....	64
Figura 19 – Efeito dos agentes de maturação no conteúdo de poliaminas (PAs) conjugadas em calos embriogênicos (E) e não-embriogênico (NE) de cana-de-açúcar.....	65
Figura 20 – Efeito do carvão ativado (CA) no conteúdo endógeno de putrescina (Put) livre, presente em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar durante a maturação	67
Figura 21 – Efeito do carvão ativado (CA) no conteúdo endógeno de espermidina (Spd) livre, presente em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar durante a maturação.....	69
Figura 22 – Efeito do carvão ativado (CA) no conteúdo endógeno de espermina (Spm) livre, presente em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar durante a maturação.....	70
Figura 23 – Conteúdo endógeno de PAs livres (Put, Spd, Spm) presente em diferentes explantes de cana-de-açúcar	72
Figura 24 – Análise da razão de PAs $[\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}]$ em diferentes tecidos e culturas de cana-de-açúcar	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ABA - ácido abscísico

ACC – ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

ADC – arginina descarboxilase

AdoMetDC – adenosil-metionina descarboxilase

Arg - arginina

BAP – 6-bezilaminopurina

BOD – câmara de germinação

CA – carvão ativado

Cit - citrulina

CONAB – “Companhia Nacional de Abastecimento”

COPERSUCAR – “Cooperativa de Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo”

CTC – “Centro de Tecnologia Canavieira”

DAH - 1,7-diaminoheptano

DAP - diaminopropano

DcSERK – Receptor quinase da embriogênese somática

E – calo embriogênico

ES - embriogênese somática

FAA – solução de fixação formaldeído 5% + ácido acético glacial 5% + álcool etílico 90%

GABA – ácido γ -aminobutírico

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

Met - metionina

MF - matéria fresca

MGBG - metilglioxal bis-guanilhidrazona

MS – “Murashige e Skoog, 1962”

NCP – N-carbamoyl putrecina

NE – calo não-embriogênico

ODC – ornitina descarboxilase

Orn - ornitina

PAs – poliaminas

PCA – ácido perclórico

PEG - polietilenoglicol

Put - putrescina

ROS – espécies reativas de oxigênio

SAM - s-adenosilmetionina

SAMDC - S-adenosilmetionina descarboxilase

SEBRAE – “Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas”

Spd - espermidina

Spm - espermina

SUCEST – “Sugarcane EST Genome Project”

UNICA – “União da Indústria de Cana-de-açúcar”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 O SISTEMA CANA-DE-AÇÚCAR	19
1.2 BIOTECNOLOGIA APLICADA À CANA-DE-AÇÚCAR.....	21
1.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	23
1.3.1 Indução e multiplicação da embriogênese somática.....	26
1.3.2 Maturação da embriogênese somática.....	28
1.4 METABOLISMO DE POLIAMINAS (PAs).....	31
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GERAL.....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	35
3.2 MANUTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO	36
3.3 EXPERIMENTOS DE MATURAÇÃO	36
3.3.1 Maturação de calos E e NE através da utilização de agentes de maturação	36
3.3.2 Determinação do efeito do CA na maturação de culturas E e NE.....	37
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	37
3.4.1 Determinação do incremento de matéria fresca (MF) e do número de embriões	37
3.4.2 Análise histomorfológica das culturas embriogênicas	38
3.4.3 Determinação de poliaminas (PAs).....	38

3.5 AMOSTRAGEM E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 OBTENÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	41
4.2 MATURAÇÃO.....	43
4.2.1 Aspectos morfológicos.....	43
4.2.2 Metabolismo de poliaminas associados com a maturação.....	57
5 CONCLUSÕES	78
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sistema cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta alógama pertencente à família Poaceae, uma gramínea perene que perfilha abundantemente na sua fase inicial de desenvolvimento (MARCHIORI, 2004; VETTORE et al., 2003). A espécie tradicionalmente cultivada, *Saccharum officinarum*, tem sido melhorada geneticamente em sucessivos cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. babieri* e *S. edule* (VETTORE et al., 2003). Como consequência destes cruzamentos, as cultivares utilizadas atualmente possuem alto grau de poliploidia, com número de cromossomos variando entre 100 e 130, indicando que a aneuploidia (presença de um número distinto de cromossomos de diferentes categorias) é comum (GRIVET e ARRUDA, 2001). Estudos revelam que a maior parte destes cromossomos são provenientes da espécie *S. officinarum* (VETTORE et al., 2003).

A temperatura, a insolação e a umidade são fatores determinantes do clima para o desenvolvimento da cana-de-açúcar, uma planta tropical que se desenvolve melhor em lugares quentes e ensolarados (MARCHIORI, 2004). Na fase de desenvolvimento vegetativo (brotação, perfilhamento e crescimento), a cultura é muito exigente em umidade e temperatura. A faixa de temperatura ótima para cultivo está entre 25 a 30 °C, sendo que abaixo de 20 °C ou acima de 35 °C o desenvolvimento vegetativo é comprometido (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS-MG, 2006). A cultura da cana-de-açúcar é cultivada principalmente em regiões situadas entre os paralelos 35° N e 35° S (ASSIS et al., 2004). Seu ciclo de desenvolvimento é de 14 a 18 meses para cada planta e 12 meses para soca (MARCHIORI, 2004).

A cultura da cana-de-açúcar destaca-se por sua alta produção de biomassa, energia e fibras, o que a torna uma das plantas com maior eficiência fotossintética (LIMA et al., 2001). O processo de maturação fisiológica de uma planta de cana-de-açúcar consiste em frear a taxa de desenvolvimento vegetativo, sem afetar o processo fotossintético, de maneira que haja maior saldo de

produtos fotossintetizados e transformados em açúcares para armazenamento nos tecidos da planta (MARCHIORI, 2004).

O Brasil possui posição de destaque no setor canavieiro, sendo o maior produtor e exportador mundial de açúcar refinado e etanol combustível veicular (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2009). Vários países das regiões tropical e subtropical cultivam cana-de-açúcar para a produção de açúcar, etanol e outros subprodutos (LIMA et al., 2001). A cana ocupa cerca de sete milhões de hectares ou cerca de 2% de toda a terra arável do país, que é o responsável por aproximadamente 70% da produção de açúcar em nível mundial, seguido pela Índia, Tailândia e Austrália (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2009; LAKSHMANAN et al., 2005).

No Brasil, há o plantio de cana-de-açúcar em todo o território nacional, mas com maior destaque para as regiões Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, o que permite duas safras por ano, de acordo com as condições climáticas da região, ou seja, durante todo o ano o Brasil produz açúcar e etanol para os mercados interno e externo (UNICA, 2009). Na safra de 2009/2010, a área cultivada no país totalizou mais de sete milhões de hectares, com previsão de colheita de mais de 612 milhões de toneladas, representando um aumento de 7% em relação à safra anterior (CONAB, 2009). Com uma produção de aproximadamente 411 milhões de toneladas na região Sudeste, o Estado de São Paulo é o maior produtor e ocupa a primeira posição no setor canavieiro nacional (CONAB, 2009). Sua importância sócio-econômica está relacionada à geração de empregos diretos e indiretos na produção de açúcar, etanol, aguardente e forragem para alimentação animal, suprindo o mercado nacional e produzindo excedentes que são exportados (SEBRAE-MG, 2006).

A recente preocupação com o aumento do aquecimento global levou ao desenvolvimento de tecnologias alternativas que diminuem a emissão de gases poluentes (SOUZA, 2006). A cana-de-açúcar é, talvez, uma das maiores conversoras de energia, caracterizando-se como uma verdadeira fonte de energia renovável e limpa. Neste contexto, o Brasil foi o pioneiro no desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, um biocombustível, que permitiu a substituição em larga escala do combustível derivado do petróleo (SOUZA, 2006). Este biocombustível tem ocupado espaços

crescentes como um produto de fonte limpa e renovável, capaz de substituir seu congêneres de origem fóssil, gasolina e diesel (CONAB, 2009). Tal crescimento, tanto no mercado doméstico como no internacional, vem transformando este produto em um novo combustível de padrão universal e despertando o interesse global pelo setor canavieiro (CONAB, 2009).

1.2 Biotecnologia aplicada à cana-de-açúcar

A maioria das pesquisas em biotecnologia aplicadas à cana-de-açúcar estão focadas na engenharia genética para obtenção de plantas transgênicas; na identificação de marcadores moleculares, associadas à caracteres agrônômicas; e na propagação clonal em biofábricas (LAKSHMANAN et al., 2005).

O uso de ferramentas bioquímicas e biotecnológicas apresenta um grande potencial de aplicação no estudo do metabolismo básico da planta e na integração com programas de melhoramento genético. Sabe-se que as plantas são constantemente bombardeadas por diversos sinais bióticos e abióticos, sendo o padrão de resposta a esses diferentes tipos de sinais, um processo altamente complexo que envolve transdução de sinais, a ativação de numerosos genes e a produção de metabólitos relacionados (INZÉ, 2005). O estudo dos mecanismos de integração de todos estes sinais levaram à determinação de vários padrões do metabolismo hormonal, que agem na planta de uma maneira tanto local quanto sistêmica, alterando o padrão de expressão de genes responsáveis por efetuar mudanças necessárias à resposta de sinais e/ou estresses.

O uso da biotecnologia no melhoramento genético de plantas depende de protocolos de regeneração *in vitro* a partir da cultura de células e/ou de tecidos, incluindo a embriogênese somática (CIDADE et al., 2006). A cultura de tecidos vegetais é definida como um conjunto de técnicas para manipulação de tecidos, realizadas em condições de alta assepsia e com rigoroso controle nutricional, de luminosidade e temperatura (TORRES et al., 1998; GEORGE et al., 2008). Neste sentido, técnicas de transformação genética e cultura de tecidos, e sua integração com programas de melhoramento têm sido fundamentais na uniformização da matéria-prima, na redução de tempo nos programas de melhoramento genético, na conservação e propagação de germoplasma de alto valor genético, permitindo

a captura e fixação de ganhos genéticos a partir de genótipos superiores, geneticamente modificados através da introdução de genes de interesse agrônomo que fornecem as características desejáveis em muitos cultivares comerciais de cana-de-açúcar (ARENCIBIA et al., 1998; LAKSHMANAN et al., 2005). A tolerância ao ataque de viroses, insetos e fungos, a resistência a herbicidas, o aprimoramento da qualidade das fibras e o uso de plantas como biorreatores são as principais características agronômicas manipuladas na transformação genética de cana-de-açúcar (ARENCIBIA et al., 1998; GALLO-MEAGHER et al., 2000).

A micropropagação (ou propagação vegetativa *in vitro*), que constitui uma das principais aplicações da cultura de tecidos vegetais, tem como vantagens a possibilidade de poder controlar as condições ambientais durante o processo de propagação, garantindo o desenvolvimento apropriado e eventuais ajustes, além de permitir a produção em larga escala de mudas saudáveis em curto espaço de tempo, utilizando uma área relativamente pequena quando comparada com o sistema convencional e ainda, aumentar a produtividade e a longevidade dos canaviais em até 30% (CRUZ et al., 2009).

Os primeiros estudos em cultura de tecidos em cana-de-açúcar foram iniciados na década de 60 com a regeneração de plântulas a partir de calos (LIU, 1983). Posteriormente, Ho e Vasil (1983) obtiveram embriões somáticos a partir de cultura de calos. Atualmente, a clonagem em cana-de-açúcar é a ferramenta biotecnológica mais amplamente utilizada no setor produtivo. A produção de mudas *in vitro* de cana-de-açúcar é um método biotecnológico já consagrado no Brasil, tendo como principais resultados a produção de mudas mais saudáveis e uniformes em uma velocidade muito mais rápida do que qualquer método convencional de propagação (LEE et al., 2007).

Entretanto, os avanços na engenharia genética em cana-de-açúcar foram obtidos a partir do final da década de 90, quando Arencibia e colaboradores (1998) publicaram os primeiros relatos de transformação de cana-de-açúcar, determinando a importância de fatores, como o uso de culturas jovens de células e a pré-indução de organogênese ou embriogênese, no sucesso do método.

Uma das dificuldades encontradas para o melhoramento genético através de métodos de transferência de genes é, o fato de que normalmente ocorre a

transformação de uma pequena porção de células-alvo, e destas apenas algumas sobrevivem com o DNA externo integrado, e entre estas, poucas são capazes de regenerar-se em plantas inteiras e normais (GARCIA et al., 2007). Uma possível razão para a perda da capacidade de regeneração dos tecidos transformados seria que os tipos de células que são capazes de incorporar um DNA externo não estão envolvidos no processo de morfogênese (SCHLAPPI e HOHN, 1992; LOWE et al., 1993; FREITAS et al., 1997). Este comportamento decorre do fato de que a transformação genética em uma espécie implica na manipulação de componentes que permeiam a transdução de sinais, explorando as redes de sinalização que detectam alterações no meio ambiente e que podem desencadear mudanças na expressão gênica.

A dificuldade de obtenção de plantas íntegras e a baixa taxa de regeneração em culturas transformadas estão entre os principais fatores limitantes para o desenvolvimento de protocolos eficientes de transformação genética em cana-de-açúcar (DESAI et al., 2004; LAKSHMANAN et al., 2005). Neste contexto, a embriogênese somática apresenta as vantagens de estar associada à alta produção de material (culturas) para o uso em bombardeamento num pequeno espaço de tempo e à possibilidade de regeneração de plantas somáticas a partir de uma única célula embriogênica (*single-cell origin*).

1.3 Embriogênese somática

A embriogênese somática é um processo análogo a embriogênese zigótica, no qual uma célula isolada ou um pequeno grupo de células somáticas, através do cultivo *in vitro*, são precursores da formação de embriões somáticos (TAUTORUS et al., 1991). Neste processo, características dos estádios embrionários podem ser observadas sem a fusão de gametas (RODRÍGUEZ et al., 1995). O desenvolvimento da embriogênese zigótica e somática apresentam alto nível de similaridade na morfologia do embrião, bem como no padrão de expressão de genes e proteínas, qualificando a embriogênese somática como um modelo efetivo para estudos em diferentes estádios de desenvolvimento do embrião (LINACERO et al., 2001; ZIMMERMAN, 1993).

O emprego da embriogênese somática pode ter uma série de aplicações que vão desde a obtenção de um modelo de referência para estudos básicos em fisiologia e bioquímica, até a propagação clonal, visando a conservação e o melhoramento genético das espécies (STEINER et al., 2008). A embriogênese somática, se eficientemente desenvolvida, possibilita a obtenção de inúmeros propágulos a partir de um pequeno número de explantes (FILIPPI et al., 2001). Embriões somáticos não são limitados pela quantidade e acessibilidade, ao contrário de embriões zigóticos que possuem difícil acesso, por serem pequenos e ligados ao tecido materno (MARSONI et al., 2008). A habilidade para induzir a embriogênese somática a partir de protoplastos, suspensões celulares e culturas de calos formou a base para uma efetiva exploração da engenharia genética para o melhoramento de cana-de-açúcar (LAKSHMANAN et al., 2005).

Na indução da embriogênese somática podemos observar dois padrões básicos: (I) o primeiro corresponde ao modelo direto no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários de calos; (II) o segundo padrão corresponde ao modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, onde estas células podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (GUERRA et al., 1999).

Comparativamente às demais técnicas de micropropagação, a embriogênese somática apresenta as seguintes vantagens: a) permite a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); b) o sistema permite um alto grau de automatização, levando a redução dos custos por unidade produzida, através da utilização de biorreatores; c) os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e pureza genética; d) pode ser utilizada como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento genético, em especial quando associada às técnicas de criopreservação e engenharia genética (GUERRA et al., 1999). Entretanto, a principal limitação dos sistemas de embriogênese somática, desenvolvidos para várias espécies, é a variação somaclonal ocorrida após

sucessivas subcultivos, e que afeta o desenvolvimento das plantas produzidas (LAKSHMANAN et al., 2005).

De acordo com Steiner e colaboradores (2008), a modulação da embriogênese somática pode ser dividida em um sistema tecnológico de dois ciclos básicos: ciclo de indução e multiplicação. O primeiro se inicia com a fase de indução de culturas embriogênicas em meio de cultura contendo auxinas, principalmente o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); e o segundo compreende a fase de multiplicação, em meio contendo auxinas em baixas concentrações. Com a retirada da auxina do meio, as culturas embriogênicas entram num ciclo de maturação, caracterizado pelo uso de promotores de maturação. Como produto deste ciclo são obtidos embriões somáticos maduros passíveis de germinação *in vitro* e *ex vitro* ou podem ainda serem utilizados para a produção de sementes sintéticas (STEINER et al., 2008) (Figura 1).

Figura 1 – Modulação da embriogênese somática. (I) Ciclo de Indução e Multiplicação e (II) Ciclo de Maturação (Adaptado de STEINER et al., 2008).

O embrião somático é um sistema bipolar onde, em uma extremidade serão diferenciadas as células do sistema radicular, que futuramente desenvolverão as raízes e, na extremidade oposta, as células a partir das quais serão geradas as folhas e os ramos (TERMIGNONI, 2005). A sua formação segue

praticamente o padrão de desenvolvimento de um embrião zigótico (que é derivado da fusão de células gaméticas) (TERMIGNONI, 2005). Uma vez que os embriões somáticos são estruturalmente similares aos embriões zigóticos, torna-se vantajoso combinar a eficiência e o baixo custo das sementes como fonte de propágulos com a produção clonal massal *in vitro* de embriões a partir de células somáticas (GUERRA et al., 1999).

1.3.1 Indução e multiplicação da embriogênese somática

A indução e multiplicação de culturas embriogênicas é uma das etapas mais importantes do protocolo de embriogênese somática. Vários fatores afetam a indução de culturas embriogênicas, dentre eles destacam-se o tipo e a fonte do explante inicial, o genótipo da planta matriz e o balanço dos reguladores de crescimento (GUERRA et al., 1999).

Auxinas e citocininas são os principais reguladores do crescimento vegetal envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular (FEHÉR et al., 2003). A auxina atua de duas maneiras durante o crescimento celular: I) estimulando a acidificação da parede celular que resulta em elevada extensibilidade; e II) induzindo a transcrição de mRNAs que codificam proteínas associadas com o crescimento celular (RICHARD et al., 2002). Já as citocininas participam de muitos aspectos do crescimento, incluindo divisão celular, dominância apical, formação e regeneração de tecidos e desenvolvimento vascular (KURAKAWA et al., 2007).

As auxinas são consideradas a classe de hormônio vegetal mais importante na regulação da embriogênese somática (COOKE et al., 1993), por serem substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação (modelos indiretos) e rediferenciação (modelos diretos), alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (GUERRA et al., 1999). Dentre os diferentes análogos à auxina, o 2,4-D é o regulador de crescimento utilizado na maioria dos sistemas de cultura de células e tecidos embriogênicos (FEHÉR et al., 2003) e provou ser o mais potente para indução de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (LAKSHMANAN et al., 2006).

As culturas resultantes do ciclo de indução e multiplicação podem possuir capacidade embriogênica distinta. Morfologicamente é possível diferenciar os tipos de calos de cana-de-açúcar, mas pouco se sabe sobre os eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem quando células somáticas tornam-se competentes para produzir embriões somáticos (NIEVES et al., 2003). Lakshmanan (2006) classificou três diferentes tipos morfológicos de calos em cana-de-açúcar com distinto potencial morfogênico: 1) culturas com aspecto duro, compacto e embriogênico; 2) macio, friável, semi-translúcido, mas não-embriogênico; e 3) mucilaginoso, macio, brilhante e não-embriogênico. Porém, Gandonou et al. (2005) observaram ainda a presença de um tipo intermediário com um tecido não-embriogênico coberto por um tecido embriogênico (Figura 2). Calos embriogênicos (E) crescem rápido e desenvolvem plantas por embriogênese somática, enquanto que calos não-embriogênicos (NE) crescem mais lentamente (NIEVES et al., 2003).

Figura 2 – Tipos morfológicos de calos de cana-de-açúcar. **A)** calo com aspecto duro, compacto e embriogênico; **B)** calo com aspecto macio, friável, semi-translúcido e não-embriogênico; **C)** calo com aspecto mucilaginoso, macio, brilhante e não-embriogênico; **D)** tipo intermediário de calo com tecido não-embriogênico (*) coberto por porções de tecido embriogênico (↘). Escala: (—) 5 mm.

Nieves e colaboradores (2003) observaram que culturas E de cana-de-açúcar apresentam maior atividade metabólica que as NE. Neste contexto, as culturas E apresentaram maiores conteúdos de proteínas solúveis, prolina livre e atividade proteolítica, quando comparados com as culturas NE (NIEVES et al., 2003). Estes resultados sugerem que o metabolismo dos compostos nitrogenados, especialmente proteínas, apresenta função determinante na aquisição e/ou perda da competência morfogênica durante a embriogênese somática em cana-de-açúcar.

De acordo com Gandonou e colaboradores (2005) por ser a capacidade embriogênica uma característica estável desde a primeira geração, seria possível prognosticar essa capacidade em uma determinada linhagem por avaliar a taxa embriogênica de seus ancestrais. A habilidade para indução de calos embriogênicos é influenciada pelo genótipo, assim como sua resposta morfogênética e habilidade de regenerar planta, indicando que estes critérios são genótipo dependentes (CIDADE et al., 2006; LAKSHMANAN, 2006; LIMA et al., 2001). Dessa forma, a indução deste tipo de cultura embriogênica é uma etapa determinante na embriogênese somática de cana-de-açúcar (GANDONOU et al., 2005).

1.3.2 Maturação da embriogênese somática

O principal esforço para a otimização do sistema de embriogênese somática em muitas espécies concentra-se principalmente, nas fases de maturação e germinação dos embriões somáticos, sendo que os meios de cultura são manipulados quanto aos tipos e concentrações de reguladores de crescimento vegetal, principalmente pela adição de agentes de maturação, como: ácido abscísico (ABA); agentes osmóticos (como PEG (polietilenoglicol) e carboidratos) e carvão ativado (CA) (THORPE, 1995; LAKSHMANAN, 2006) (Figura 1).

Estudos são necessários para a elucidação do envolvimento de reguladores de crescimento vegetal na aquisição da competência embriogenética e na progressão e maturação de embriões somáticos (JIMÉNEZ, 2001). Os reguladores de crescimento são considerados os principais fatores envolvidos no desencadeamento da morfogênese vegetal induzida *in vitro*, inclusive da embriogênese somática (GAJ et al., 2006).

Os últimos estádios da embriogênese de plantas que levam a maturação do embrião são caracterizados pela perda de água que leva a dessecação do embrião e ao início do programa de dormência (LINACERO et al., 2001). Durante este período, os níveis de ABA aumentam e chegam a altas concentrações (LINACERO et al., 2001). O ABA pode atuar em vários eventos, incluindo a inibição da germinação precoce, a indução da síntese de proteínas de reserva

envolvidas no aumento da tolerância à desidratação e a indução da dormência (ROCK e QUATRANO, 1996). Usualmente, os níveis endógenos de ABA aumentam durante o desenvolvimento inicial da semente e diminuem durante a maturação do embrião (SILVEIRA et al., 2008).

Na embriogênese somática, a incorporação do ABA ao meio de cultura é amplamente utilizada para estimular o processo de maturação, provocando mudanças na morfologia, no padrão de expressão gênica e no metabolismo de substâncias de reserva (SALAJOVA et al., 1999). O ABA também detém um papel fundamental na histodiferenciação dos embriões somáticos durante a maturação (GUTMANN et al., 1996).

A presença de um gradiente osmótico é uma característica das sementes em desenvolvimento, que favorece a movimentação da água e a histodiferenciação do embrião zigótico (STASOLLA e YEUNG, 2003). O PEG é um agente osmótico não plasmolizante, que não adentra nas células vegetais, e que quando adicionado ao meio de cultura gera estresse hídrico nas células (SVOBODOVÁ et al., 1999). A adição de agentes osmóticos, como o PEG, ao meio de cultura reduz a disponibilidade de água, simulando as condições do desenvolvimento do embrião zigótico (SILVEIRA, 2004). Embora embriões somáticos não passem por dessecação ou tornem-se dormentes, vários genes que são preferencialmente expressos durante a dessecação do embrião zigótico, como os genes *lea*, também são expressos durante a embriogênese somática (LINACERO et al., 2001; ZIMMERMAN, 1993). Os genes *lea* tem uma expressão modulada por ABA em estádios tardio de embriogênese (LINACERO et al., 2001). Proteínas LEA são hidrofílicas e devido ao período desta expressão e sua indução por ácido abscísico (ABA), elas parecem funcionar como protetores de dessecação do embrião zigótico (LINACERO et al., 2001). O ABA desempenha um importante papel regulatório na embriogênese de plantas e durante respostas de estresse ambiental envolvendo perda de água (LINACERO et al., 2001; CHANDLER e ROBERTSON, 1994).

O ABA e agentes osmóticos possuem efeitos aditivos na síntese de proteínas de reserva, sendo que a síntese destes polipeptídios é iniciada pela adição de ABA, mas é necessária a combinação com agentes osmóticos para completar sua síntese. O ABA teria função inicial na regulação da expressão

gênica e o agente osmótico regularia a síntese de proteína a nível pós-transcricional (ATTREE e FOWKE, 1993). Segundo Bewley e Black (1994), durante o desenvolvimento das sementes, muitos dos efeitos fisiológicos e bioquímicos induzidos pelo ABA também podem ser induzidos por baixos potenciais osmóticos.

Outra substância que potencializa as respostas de maturação da embriogênese somática é o carvão ativado (CA). O CA, embora não seja um regulador de crescimento, vem sendo utilizado com frequência para otimizar ou regular a morfogênese *in vitro* (LAMEIRA et al., 1997; PAN e STADEN, 1999; NHUT et al., 2001). Os solutos em contato com o CA em uma solução serão adsorvidos até que um equilíbrio entre as moléculas adsorvidas e as não-adsorvidas seja estabelecido (THOMAS, 2008). O seu efeito benéfico é atribuído à adsorção de substâncias inibitórias do crescimento e desenvolvimento vegetal (THOMAS, 2008) como: reguladores de crescimento residuais, vitaminas, etileno (VAN WINKLE et al., 2003), e compostos fenólicos (PERERA et al., 2008) presentes no meio de cultura. O CA também promove a estabilização do pH do meio de cultura (OWEN et al., 1991) e o estabelecimento de um ambiente escurecido simulando as condições ambientais de luminosidade (DUMAS e MONTEUUIS, 1995).

O CA desempenha papel crítico na micropropagação, na germinação de sementes, na embriogênese somática, na cultura de anteras, na produção de sementes sintéticas, na cultura de protoplastos e na formação de bulbos, entre outros (THOMAS, 2008), sendo utilizado na cultura de tecidos principalmente para estimular o enraizamento, restaurar a capacidade embriogênica em calos envelhecidos e diminuir a intoxicação de explantes pelos fenóis oxidados, produzidos pelos próprios tecidos *in vitro* (TORRES et al., 1998).

Alguns trabalhos apontam que a adsorção não seletiva de substâncias residuais nas culturas embriogênicas, especialmente reguladores de crescimento residuais da fase de multiplicação, podem influenciar na resposta da cultura, e outros sugerem que o CA pode adsorver rapidamente algumas substâncias do meio de cultura e, posteriormente, liberar gradualmente para o substrato, suprimindo uniformemente a demanda da cultura embriogênica durante todo o período de cultivo (THOMAS, 2008).

O estudo da embriogênese somática envolve vários fatores, como reguladores de crescimento, que apresentam efeitos diretos sobre os processos fisiológicos e bioquímicos nas várias etapas da embriogênese (SILVEIRA et al., 2004a; 2004b; 2006; 2008; SANTA-CATARINA et al., 2007; STEINER et al., 2007; 2008; DIAS et al., 2009). Dentre os aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares associados à embriogênese somática estão inclusos os estudos sobre o metabolismo de poliaminas (PAs).

1.4 Metabolismo de poliaminas (PAs)

As PAs são aminas policatiônicas alifáticas de baixo peso molecular, contendo cargas positivas nos seus átomos de nitrogênio, uma propriedade que facilita sua interação com macromoléculas como DNA e RNA, fosfolipídios, componentes da parede celular e proteínas (BARON e STASOLLA, 2008).

As PAs estão presentes em todos os compartimentos da célula vegetal, indicando sua participação em diversos processos fundamentais na célula, que abrangem desde a transcrição e o processamento de RNA à ativação da proteína, além de mudanças na fluidez da membrana (KUZNETSOV et al., 2006). Elas estão presentes em diversos organismos tais como bactérias, fungos, animais e vegetais superiores (WALLACE et al., 2003). Estas aminas podem formar conjugados chegando a 90% de seu conteúdo e estão associadas com florescimento, síntese de metabólitos e resposta a infecções virais (SLOCUM e GALSTON, 1985; BAIS et al., 2001).

Em plantas, especificamente, as PAs estão envolvidas em diferentes processos de crescimento e desenvolvimento em resposta a estresses bióticos e abióticos. A concentração total e as razões entre PAs individuais variam dependendo da espécie, órgão e tecido vegetal e, também, do estágio de desenvolvimento (KUZNETSOV et al., 2006).

O metabolismo de PAs envolve: (I) a biossíntese de Putrescina (Put) a partir dos aminoácidos arginina e/ou ornitina pelas enzimas arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC), respectivamente; (II) a conversão de Put em espermidina (Spd) e, subsequentemente, em espermina (Spm) por adições sucessivas de radicais aminopropil a partir da S-

adenosilmetionina (SAM) descarboxilada, que é produto da reação da SAM descarboxilase (SAMDC) (Figura 3); e (III) o catabolismo de Put, Spd e Spm por diamina e PA oxidases (MINOCHA et al., 2004; KUZNETSOV et al., 2006).

Figura 3 – Esquema da biossíntese de poliaminas em plantas (Adaptado de KUZNETSOV et al., 2006).

Trabalhos recentes têm mostrado que as PAs podem ser usadas como biomarcadores durante a embriogênese zigótica e somática (SILVEIRA et al., 2006, SANTA-CATARINA et al., 2007). Na embriogênese somática de *Picea rubens*, foi relatado que a poliamina predominante no tecido pró-embriogênico é a Put, enquanto a Spm predomina durante o desenvolvimento do embrião (MINOCHA et al., 2004). Em outras espécies, como *Ocotea catharinensis* (SANTA-CATARINA et al., 2007) e *Araucaria angustifolia* (SILVEIRA et al., 2006) as razões de PAs livres mostraram variações durante os diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático.

A Spm é biologicamente mais ativa que as demais PAs, agindo na estabilização das membranas celulares pela redução do transporte transmembrana dos fosfolipídios, interagindo com proteínas nucleares que determinam a configuração espacial do DNA, estimulando a atividade de síntese de pectinas e hemicelulose, além de exercer ação antioxidante (BOUCHEREAU et al., 1999).

Feirer (1995) sugeriu que altos níveis de Spd nas culturas embriogênicas estão correlacionados com a sua competência embriogenética. Os níveis endógenos de Put livre foram correlacionados positivamente com o crescimento de culturas embriogênicas de *Pinus oocarpa*, *Pinus patula* (FEIRER, 1995) e *Pinus sylvestris* (SARJALA et al., 1997).

O metabolismo de PAs está diretamente relacionado com a competência embriogenética de culturas embriogênicas (SILVEIRA, 2004), sendo que o estudo dos níveis endógenos de PAs e o melhor entendimento da influência do seu metabolismo durante a formação e desenvolvimento do embrião podem aumentar a eficiência da embriogênese.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a relação entre os conteúdos endógenos de poliaminas (PAs), associados com a determinação da competência embriogenética e a maturação e progressão de embriões somáticos em cana-de-açúcar.

2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar o metabolismo de PAs em culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos de maturação;
- b) Determinar os efeitos da adição de agentes de maturação (PEG, ABA e CA) nos níveis endógenos de PAs durante a maturação dos embriões somáticos;
- c) Monitorar o crescimento celular e a morfogênese *in vitro* durante o processo de maturação dos embriões somáticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas culturas embriogênicas e não-embriogênicas da variedade SP-803280 de plantas obtidas a partir de toletes fornecidos pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) da cidade de Piracicaba-SP. A SP-803280 foi a variedade utilizada no projeto SUCEST (que disponibilizou 290 mil seqüências de DNA desta espécie) (VETTORE et al., 2001). É uma variedade reconhecida pelo alto teor de sacarose e produtividade em soqueira; o seu perfilhamento é intermediário devido ao crescimento inicial vigoroso; seu teor de fibra é alto, e a exigência em fertilidade do solo é média; apresenta sensibilidade média a herbicidas e resistência a algumas doenças como o mosaico e ferrugem (COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2009).

Em resumo, os calos foram induzidos, utilizando como material inicial plantas com aproximadamente 30 cm de altura (2 a 3 meses de plantio). Os palmitos das plantas foram submetidos à assepsia em câmara de fluxo laminar utilizando-se etanol 70% (1 min) e água sanitária comercial 40% (0,8 a 1% de cloro ativo) (15 min), seguida de três lavagens em água esterilizada. Após a assepsia a porção da região meristemática central foi seccionada transversalmente em cortes de aproximadamente 3 mm, e estes foram utilizados como explantes. Os explantes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (20 g.L⁻¹), ágar (7 g.L⁻¹) e 2,4-D (10 µM). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 15 min.

Os calos foram classificados em embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) conforme suas características morfológicas de acordo com Lakshmanan (2006).

3.2 Manutenção e multiplicação

Os calos foram repicados em intervalos de 21 dias para o meio de multiplicação, composto por meio de cultura MS, sacarose (20 g.L⁻¹), ágar (7 g.L⁻¹) e 2,4-D (10 µM) em placas de Petri. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e então autoclavado a 121 °C por 15 min. As culturas embriogênicas e não-embriogênicas foram mantidas em câmara de crescimento, à temperatura de 25 ± 1 °C, no escuro.

3.3 Experimentos de maturação

3.3.1 Maturação de calos E e NE através da utilização de agentes de maturação

Calos E e NE da cultivar SP-803280 foram submetidos a tratamentos de maturação. Nas duas culturas celulares foram testados os efeitos da adição de ABA (20 µM), PEG-3350 (3%), ABA + PEG-3350 (20 µM + 3%), benzilaminopurina (BAP) (1 µM) e na ausência de 2,4-D. O meio de cultura com 2,4-D (utilizado na manutenção dos calos) foi considerado o controle, totalizando assim, cinco tratamentos. Em todos os tratamentos foi utilizado o meio de cultura MS, suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹) e ágar (7.0 g.L⁻¹). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 e posteriormente autoclavados a 121 °C por 15 min. Cinco colônias de 200 mg de calos E e NE foram inoculadas em placas de Petri contendo 25 mL do meio de cultura do respectivo tratamento. Cada tratamento foi composto por vinte repetições. Após a inoculação, as placas de Petri foram mantidas no escuro durante sete dias, após este período as placas de todos os tratamentos foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16h de luz.

Foram realizados dois subcultivos em intervalos de 30 dias. Ao final do segundo subcultivo (60 dias) todas as colônias foram caracterizadas morfológicamente e, em fluxo laminar, foram pesadas para a determinação da matéria fresca (MF). Parte do material vegetal resultante foi reservada para o preparo das amostras. As amostras foram individualizadas e armazenadas em freezer com temperatura de -20 °C para posterior determinação de PAs.

Devido a baixa resposta para maturação de embriões somáticos, após 60 dias de cultivo, parte dos calos de cada tratamento foram transferidos para meio MS suplementado com sacarose (20 g.L^{-1}), ágar (7.0 g.L^{-1}) e CA (1.5 g.L^{-1}), visando o aumento na resposta de maturação. Ao final de trinta dias de cultivo neste novo meio de cultura, amostras foram coletadas, pesadas e posteriormente mantidas em freezer com temperatura de $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, para a determinação de poliaminas.

3.3.2 Determinação do efeito do CA na maturação de culturas E e NE

Em todos os tratamentos foi utilizado o meio de cultura MS, suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}) e ágar (7.0 g.L^{-1}). Foram testados os efeitos de diferentes concentrações de CA (0.0; 0.75; 1.5 e 3.0 g.L^{-1}). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8. O substrato foi autoclavado a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Seis colônias de 200 mg de calos E e NE foram inoculadas em placas de Petri contendo 25 mL do meio de cultura do respectivo tratamento. Cada tratamento foi composto por quatro repetições, totalizando 16 placas. Após a inoculação, as placas de Petri foram mantidas no escuro durante sete dias, após este período foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16h de luz.

A cada 7 dias, após o início da indução da maturação das culturas, cada colônia foi caracterizada morfolologicamente, pesadas para a determinação do aumento de MF e, em seguida armazenadas em freezer com temperatura de $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior determinação de poliaminas.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Determinação do incremento de matéria fresca (MF) e do número de embriões

A análise no incremento de MF das culturas E e NE nos tratamentos de maturação que utilizou diferentes agentes de maturação, foi realizada através da comparação entre a MF inicial de 200 mg, e a MF observada ao final de cada experimento.

Nos tratamentos com concentrações diferentes de CA, a análise no aumento de MF das culturas E e NE, foi realizada periodicamente a cada 7 dias de cultivo e tomando como MF 200 mg para cada calo. Um total de seis calos por tratamento foram pesados, semanal e separadamente, para estabelecimento de curva de crescimento durante o período de maturação.

Para a contagem do número de embriões somáticos, os calos foram divididos aleatoriamente em porções de 100 mg e o número de embriões somáticos/plântulas somáticas foi realizada manualmente com o auxílio de estereomicroscópio (Bauch & Lomb®). As avaliações foram realizadas a cada sete dias de cultivo.

3.4.2 Análise histomorfológica das culturas embriogênicas

Ao final de cada experimento de maturação foram coletadas amostras para a análise histomorfológica, objetivando a comprovação de que plântulas somáticas observadas foram obtidas por embriogênese somática. Cada porção de calo passou por um processo de fixação em solução FAA (formaldeído 5% + ácido acético glacial 5% + álcool etílico 90%) sob vácuo, posteriormente foram realizadas sucessivas lavagens em álcool etílico iniciando em 30% e gradativamente aumentando a concentração até 100%. Após completa desidratação, o material vegetal foi emblocado em historesina seguindo o protocolo do fabricante Leica Historesin®, esperou-se secagem completa. O material emblocado foi seccionado em micrótomo em cortes com 10 µm de espessura que foram fixados nas lâminas e corados em solução de azul de toluidina. As lâminas foram visualizadas em microscópio Carl Zeiss®, e as imagens registradas e digitalizadas.

3.4.3 Determinação de poliaminas (PAs)

A metodologia para a determinação de PAs livres foi baseada na técnica descrita por Silveira et al. (2004a). Amostras de 200 mg de MF de todos os tratamentos foram maceradas em 1,4 mL de ácido perclórico (PCA) 5% (v/v). O material macerado foi incubado no gelo por 1 h e posteriormente centrifugado a 20.000g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi reservado. O sedimento foi então

ressuspendido em 200 µL de PCA 5% e submetido a uma nova centrifugação. O sobrenadante da última centrifugação foi adicionado ao primeiro sobrenadante para quantificação das PAs livres.

As PAs conjugadas foram extraídas por hidrólise ácida, utilizando-se 200 µL do sobrenadante em volume igual de HCl 12 N, por 18 h a 110 °C no escuro. Posteriormente, as amostras foram secas a 40 °C sob jato de nitrogênio e ressuspendidas em 180 µL de PCA 5%.

As PAs livres e conjugadas foram em seguida derivatizadas. Na derivatização, para 40 µL de cada amostra utilizou-se 100 µL de cloreto de dansil (5 mg.mL⁻¹ em acetona), 50 µL de solução saturada de carbonato de sódio (NaHCO₃) e 20 µL de 1,7-diaminoheptano (DAH), que foi utilizado como controle interno por ser uma substância que não é produzida endogenamente e que se liga ao cloreto de dansil. Após a mistura, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min à temperatura de 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina pela adição de 25 µL de solução de prolina (100 mg.mL⁻¹) com posterior incubação por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Finalmente, as PAs foram particionadas com 200 µL de tolueno. A fase orgânica contendo as PAs foi coletada, seca em jato de N₂ e ressuspendida em 175 µL de acetonitrila.

A identificação e quantificação das PAs foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Como fase móvel foram utilizadas as soluções de acetonitrila absoluta e acetonitrila 10% em água, com pH de 3,5 ajustado com HCl 1 N. O programa de eluição da fase móvel iniciou com 65% de acetonitrila absoluta e foi gradativamente aumentado até 100%, durante um tempo total de corrida de 44 min com fluxo de 1 mL.min⁻¹, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado com o comprimento de onda de excitação a 340 nm e emissão a 510 nm. Foram injetados 20 µL de cada amostra derivatizada com o cloreto de dansil. As áreas dos picos e tempos de retenção de cada PA da amostra foram avaliados por comparação com concentrações conhecidas de Put, Spd e Spm.

3.5 Amostragem e análise estatística

Os experimentos de maturação foram realizados utilizando pelo menos quatro repetições por tratamento. As análises de matéria fresca e poliaminas foram conduzidas com o uso de 10 e 5 repetições, respectivamente. Os dados obtidos foram representados com média e desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de culturas embriogênicas

A cultura de tecidos oferece a oportunidade de produzir em um curto espaço de tempo uma grande quantidade de propágulos livres de doenças e com qualidade genética superior (LAKSHMANAN et al., 2006). A retirada de um fragmento de tecido de um organismo íntegro e a sua colocação em meio de cultura que contém nutrientes e reguladores de crescimento trazem como consequência a perda do controle das células, expondo-as a uma nova condição, na qual a capacidade de divisão pode ser readquirida (desdiferenciação) e o controle da expressão gênica pode ser alterado conduzindo-as a novos padrões de diferenciação (HANDRO e FLOH, 1990).

A indução de calos E é uma etapa determinante na embriogênese somática de cana-de-açúcar, influenciando diretamente a capacidade de obtenção de embriões somáticos e a regeneração de plantas (DE VITA, 2008). Sendo assim, a indução é uma fase preparatória, com ativação do metabolismo, que culmina com a divisão celular (HANDRO e FLOH, 1990).

A indução de culturas celulares em cana-de-açúcar foi obtida a partir de explantes, de folhas jovens, cortadas transversalmente e inoculadas em meio de cultura básico e em presença de 2,4-D (10 μ M) (Figura 4). A utilização de 2,4-D (10 μ M) na ausência de luz foi capaz de induzir a formação de calos E e NE. O 2,4-D, que é uma auxina sintética forte, é comumente utilizado para a indução de culturas E em várias espécies da família *Poaceae*, assim como em cana-de-açúcar (LAKSHMANAN et al., 2006; GARCIA et al., 2007).

Figura 4 – Esquema de indução da embriogênese somática em de cana-de-açúcar. **A)** Plantas crescidas em substrato comercial com aproximadamente 30 cm de altura; **B)** porção medular formada pelas folhas mais jovens; **C)** seção transversal utilizada como explante na indução dos calos em meio de cultura contendo 2,4-D; **D)** explante apresentando a desdiferenciação no início do processo de indução; **E)** calo induzido. Escalas: B) (—) 15 mm; C) (—) 5 mm; D) (—) 5 mm; E) (—) 5 mm.

Foram obtidos dois tipos morfológicos de calos com distintos potenciais morfogenéticos: I) calo embriogênico, com característica nodular, compacta e facilmente destacável da estrutura original (Figura 5A) e, II) calo não-embriogênico, com característica mucilaginosa e translúcida (Figura 5B).

Figura 5 – Análise morfológica da capacidade embriogênica em calos de cana-de-açúcar. **A)** Calo embriogênico (E); **B)** calo não-embriogênico (NE). Escala: (—) 5 mm.

A capacidade de produção de calos em cana-de-açúcar tem sido descrita como sendo uma resposta genótipo-dependente (CIDADE et al., 2006, LAKSHMANAN, 2006), assim como já descrito em arroz e café (GANDONOU et al., 2005). Cidade et al. (2006) destaca a forte influência do genótipo na resposta morfogênica, tornando-se necessárias adaptações de protocolos para cada cultivar a ser utilizada em determinado estudo.

4.2 Maturação

4.2.1 Aspectos morfológicos

Em todos os experimentos de maturação realizados, foram utilizados calos E e NE. Observou-se que as culturas NE submetidas aos tratamentos de maturação, não foram capazes de promover a diferenciação de embriões somáticos. As culturas NE apresentaram uma alta produção de pigmentos cianicos, possivelmente antocianinas, caracterizadas pelo aspecto roxo das células superficiais, além de um alto grau de oxidação (Figura 6), enquanto os calos E apresentaram respostas na evolução morfogênética das culturas culminando na diferenciação de embriões somáticos (Figura 7).

Figura 6 – Morfologia de calos não-embriogênicos (NE) submetidos aos tratamentos de maturação. **A)** meio de cultura MS suplementado com 10 μ M de 2,4-D (controle); **B)** meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou agentes de maturação; **C)** meio de cultura MS

suplementado com 1 μ M de BAP; **D**) meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG; **E**) meio de cultura MS suplementado com 20 μ M de ABA; **F**) meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG e 20 μ M de ABA. Escala: (—) 5 mm.

Figura 7 – Morfologia de calos embriogênicos (E) submetidos aos tratamentos de maturação. **A)** meio de cultura MS suplementado com 10 μ M de 2,4-D (controle); **B)** meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou agentes de maturação; **C)** meio de cultura MS suplementado com 1 μ M de BAP; **D)** meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG; **E)** meio de cultura MS suplementado com 20 μ M de ABA; **F)** meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG e 20 μ M de ABA. Setas indicam a organização de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. Escala: (—) 5 mm.

Na avaliação morfo-histológica, dos calos E submetidos aos diferentes tratamentos de maturação foi possível visualizar a organização de centros meristemáticos e a morfogênese dos embriões somáticos (Figura 8A), característica do processo de embriogênese somática. Esta organização não foi observada nos calos NE, quando submetidos à maturação (Figura 8).

Figura 8 – Cortes histológicos em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar. **A)** Calo embriogênico submetido a tratamento de maturação em meio de cultura MS sem a suplementação de agentes de maturação; com formações de embriões somáticos (ES) em estágio globular e conectado ao calo; **B)** Calos não-embriogênicos com distribuição de células desordenadas. Aumento 2,5x.

Oropeza e colaboradores (2001) estudaram as diferenças histomofológicas entre calos E e NE de cana-de-açúcar e verificaram algumas características citológicas em cada tipo de célula: os calos E apresentam núcleo proeminente e uma alta atividade metabólica com níveis elevados de proteínas, mRNAs e outros componentes citoplasmáticos. Por outro lado, os calos NE possuem citoplasma com poucos grânulos de amido o que implica em uma baixa atividade metabólica (OROPEZA et al., 2001).

Visando o aumento na resposta de formação de embriões somáticos e conversão de plantas, os calos E foram transferidos para o meio de cultura MS desprovido de regulador de crescimento ou promotores de maturação, mas suplementado com carvão ativado (CA). Após transferência para o meio de cultura suplementado apenas com CA (1.5 g.L^{-1}) observou-se que os calos provenientes do tratamento controle (MS suplementado com 2,4-D ($10 \mu\text{M}$)) continuou a não promover diferenciação de embriões, e os tratamentos MS (sem a suplementação de reguladores de crescimento ou agentes de maturação) e BAP ($1 \mu\text{M}$) apresentaram respostas para a diferenciação de embriões somáticos e conversão de plantas aumentadas, entretanto, o tratamento que apresentou a melhor resposta na maturação dos embriões somáticos foi o suplementado com PEG-3350 (3%) (Figura 9).

Figura 9 – Morfologia de calos embriogênicos (E) submetidos aos tratamentos de maturação na presença de carvão ativado (CA). **A)** meio de cultura MS suplementado com 10 µM de 2,4-D (controle); **B)** meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou agentes de maturação; **C)** meio de cultura MS suplementado com 1 µM de BAP; **D)** meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG; **E)** meio de cultura MS suplementado com 20 µM de ABA; **F)** meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG e 20 µM de ABA. Escala: (—) 5 mm.

De acordo com Lameira e colaboradores (1997) o CA além de adsorver compostos fenólicos liberados pelo explante, também é capaz de adsorver reguladores de crescimento como o 2,4-D, BAP e ABA. Assim, a concentração ótima desses reguladores no meio de cultura varia de acordo com a capacidade de adsorção do CA.

Outro parâmetro morfológico avaliado foi a variação na matéria fresca (MF). Neste sentido, o incremento em MF variou consideravelmente entre os calos E e NE submetidos aos tratamentos de maturação (Figura 10). Em todos os tratamentos de maturação, os calos E apresentaram um maior aumento em MF quando comparados com os NE, principalmente nos tratamentos que resultaram na maturação de embriões somáticos (Figura 9 e 10). O baixo incremento na MF dos calos NE foi decorrente do elevado nível de oxidação destas culturas em resposta os tratamentos de maturação (Figura 6).

Figura 10 – Variação de matéria fresca (MF) de calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) submetidos aos tratamentos de maturação. **Controle** - meio de cultura MS suplementado com 10 μ M de 2,4-D; **MS** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou agentes de maturação; **BAP** - Meio de cultura MS suplementado com 1 μ M de BAP; **PEG** - Meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG; **ABA** - Meio de cultura MS suplementado com 20 μ M de ABA; **ABA+PEG** - Meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG e 20 μ M de ABA. A linha (---) representa a MF inicial. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão (n=10).

Durante a fase de multiplicação o 2,4-D, uma auxina sintética forte, no meio de cultura mantém estável as taxas de multiplicação celular nas culturas em cultivo. A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura, especialmente auxinas, induz a multiplicação das células (SILVEIRA et al., 2004a), sendo requeridas na divisão celular para a manutenção do ciclo celular (STALS e INZÉ, 2001). A retirada do 2,4-D e a adição de agentes de maturação resultam num desequilíbrio das taxas basais de divisão celular e, em decorrência disso, afeta o crescimento celular.

Neste contexto, os calos E mantidos nos tratamentos de maturação MS, BAP (1 μ M) e PEG-3350 (3%), que propiciaram o desenvolvimento de embriões somáticos, apresentaram um maior incremento em MF (Figura 10). Os calos E, mantidos nos tratamentos ABA (1 μ M) e ABA+PEG-3350 (1 μ M+3%) apresentaram um menor incremento de MF quando comparado com os demais tratamentos. Embora alguns trabalhos, mostrem que em algumas espécies a maturação de embriões somáticos é acompanhada pela redução da proliferação

das culturas embriogênicas (ATTREE e FOWKE, 1993; VON ARNOLD et al., 2002; SHOJI et al., 2006), neste trabalho foi observado o incremento em MF nos tratamentos que propiciaram a maturação de embriões somáticos de cana-de-açúcar.

Como foi discutido anteriormente, a transferência dos calos para o meio de cultura com CA promoveu um aumento substancial na resposta de maturação nos calos E. Neste sentido, visando determinar o efeito do CA na maturação de culturas embriogênicas foi instalado um segundo experimento de maturação em que foram testadas diferentes concentrações de CA.

Neste experimento de maturação com CA, o incremento em MF variou entre os calos utilizados E e NE (Figura 11). Os dados observados neste experimento corroboram com àqueles obtidos anteriormente, em que os calos NE apresentaram um crescimento inferior quando comparados com os calos E. Observou-se que não houve diferença expressiva no crescimento dos calos entre as diversas concentrações de CA utilizadas (Figura 11B). Analisando o aumento da massa celular dos calos E, houve um crescimento progressivo das culturas submetidas aos tratamentos com CA até o 21º dia de cultivo, com uma posterior redução do incremento no 28º dia (Figura 11A). Essa redução não foi observada no tratamento controle (sem adição de CA), que manteve o crescimento celular elevado.

Figura 11 – Variação de matéria fresca (MF) de calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) para determinação do efeito do carvão ativado (CA) na maturação. Pesagens realizadas em intervalos de 7 dias até o 28º dia de cultivo. **A)** Embriogênico: **0E** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1E** - Meio de cultura MS suplementado com 0,75 g.L de CA; **2E** - Meio de cultura MS suplementado com 1,5 g.L de CA; **3E** - Meio de cultura MS suplementado com 3 g.L de CA. **B)** Não-embriogênico: **0NE** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1NE** - Meio de cultura MS suplementado com 0,75 g.L de CA; **2NE** - Meio de cultura MS suplementado com 1,5 g.L de CA; **3NE** - Meio de cultura MS suplementado com 3 g.L de CA. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão (n=10).

Nossos resultados indicam que a embriogênese somática de cana-de-açúcar não está associada à uma redução na atividade de divisão celular para

que ocorra a evolução morfogênica das culturas durante a maturação. No processo de diferenciação do embrião somático ocorrem intensos processos de divisão e crescimento em volume celular que resultam na formação em embriões somáticos em diferentes estádios. Segundo Bertoldi et al. (2004), esse aumento da MF também pode estar relacionado ao aumento do conteúdo de água intracelular, que ocorre em células embriogênicas em diferentes estádios de maturação, especialmente nos embriões em estádios mais avançados de desenvolvimento e em calos com embriões germinados, com a presença de plântulas. Além disso, calos E de cana-de-açúcar apresentam uma atividade metabólica alta, levando assim, à um aumento do conteúdo endógeno de proteínas solúveis e, conseqüente aumento da MF.

Os resultados referentes aos efeitos do CA na morfogênese das culturas embriogênicas revelaram que os calos E de cana-de-açúcar foram responsivos aos tratamentos de maturação, apresentado uma evolução embriogenética expressiva, resultando na produção de embriões e plântulas somáticas e no aumento de incremento de MF durante a maturação. Os calos NE não foram responsivos durante os tratamentos de maturação, reduzindo o incremento de MF e resultando na oxidação dos tecidos.

Para um melhor acompanhamento das alterações morfológicas das culturas, foram realizadas observações periódicas a cada sete dias, o que evidenciou uma progressão cronológica da resposta morfológica dos calos E e NE (Figura 12 e 13). Como observado no experimento anterior, com diferentes agentes de maturação, as culturas NE submetidas às diferentes concentrações de CA, não foram capazes de promover a diferenciação de embriões somáticos. Também foi possível observar uma alta produção de pigmentos, possivelmente antocianinas (coloração arroxeada das células), além do alto grau de oxidação (Figura 13).

Figura 12 – Resposta morfológica de calos embriogênicos (E) submetidos aos tratamentos de maturação na presença de diferentes concentrações de carvão ativado (CA). **0E** - meio de cultura MS sem a suplementação de CA ou regulador de crescimento; **1E** - meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L⁻¹ de CA; **2E** - meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L⁻¹ de CA; **3E** - meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L⁻¹ de CA. Escala: (—) 5mm.

Figura 13 – Resposta morfológica de calos não-embriogênicos (NE) submetidos aos tratamentos de maturação na presença de diferentes concentrações de carvão ativado (CA). **0NE** - meio de cultura MS sem a suplementação de CA ou regulador de crescimento; **1NE** - meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L⁻¹ de CA; **2NE** - meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L⁻¹ de CA; **3NE** - meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L⁻¹ de CA. Escala: (—) 5mm.

O CA promoveu a evolução embriogênética em calos E, resultando na maturação das massas pró-embriogênicas em embriões somáticos, e posteriormente no desenvolvimento de plântulas somáticas (Figura 12). Os tratamentos de maturação suplementados com 0,75 e 1,5 g.L⁻¹ de CA (1E e 2E, respectivamente) foram os que apresentaram as maiores freqüências de formação de embriões somáticos ao final dos 28 dias de cultivo (Tabela 1). No tratamento 2E, suplementado com 1,5 g.L⁻¹ de CA, foi possível a visualização de todas as etapas de desenvolvimento desde a formação inicial dos embriões somáticos até 14º dia de cultivo, sendo que a partir do 21º dia, a evolução do desenvolvimento embriogênético, promoveu a síntese de clorofila e conseqüente evolução dos embriões em plântulas somáticas de cana-de-açúcar (Figura 12).

Tabela 1. Efeito do carvão ativado (CA) no número de embriões somáticos e/ou plântulas somáticas (em 100 mg de MF) formados nos diferentes tratamentos durante a maturação de calos embriogênicos (E) de cana-de-açúcar.

Dias de cultivo <i>in vitro</i>	Tratamentos			
	*0E	1E	2E	3E
	Número de embriões e plântulas			
0 dias	0	0	0	0
7 dias	0	0	0	0
14 dias	12 ± 3,61	114 ± 3,61	158 ± 11,93	29 ± 1,53
21 dias	97 ± 7,94	120 ± 15,72	120 ± 11,59	129 ± 15,31
28 dias	110 ± 15,70	181 ± 17,50	160 ± 11,68	74 ± 11,68
Total (nº de embriões e plântulas)	219	415	438	232

*. 0E - Meio de cultura MS sem a suplementação de CA ou regulador de crescimento; 1E - meio de cultura MS suplementado com 0,75 g.L⁻¹ de CA; 2E - meio de cultura MS suplementado com 1,5 g.L⁻¹ de CA; 3E - meio de cultura MS suplementado com 3 g.L⁻¹ de CA.

Nos calos E, em geral, até o sétimo dia de cultivo foi observado a organização dos tecidos com características embriogênicas (Figura 14A), com respostas morfogênicas semelhantes em todos os tratamentos. Até o 10º dia de cultivo foram observados apenas embriões somáticos nos estádios iniciais, mesmo no tratamento sem adição de CA (0E) (Figura 14B). Até o 21º dia de cultivo, os calos apresentaram respostas morfogênicas similares em todos os tratamentos, apresentando embriões somáticos clorofilados (Figura 14C). Contudo, no 28º dia, o tratamento 3E (3.0 g.L⁻¹ de CA) apresentou uma redução da evolução no desenvolvimento de embriões. Além disso, os calos mantidos nos tratamentos 0E; 1E e 2E (0.0; 0.75 e 1.5 g.L⁻¹ de CA, respectivamente) sofreram uma evolução morfogênica que

culminou tanto no aumento da formação de embriões como na obtenção de plântula somáticas (Figura 14D; E; F) (Tabela 1).

Figura 14 – Diferentes fases do desenvolvimento embrionário durante a embriogênese somática (ES) de cana-de-açúcar, durante a maturação em meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L^{-1} de carvão ativado (CA). **A)** Massa pró-embriônica (7 dias de cultivo); **B)** Embrião somático em estágio inicial de desenvolvimento (7 dias de cultivo); **C)** Embrião somático em fase de transição (14 dias de cultivo); **D)** Embriões somáticos em desenvolvimento (↖) (28 dias de cultivo); **E)** Plântulas somáticas apresentando diferentes estágios de desenvolvimento: estágio inicial de desenvolvimento da plântula (↗) (28 dias de cultivo); plântula somática em estágio avançado de desenvolvimento apresentando os primórdios foliares (↗) (28 dias de cultivo); **F)** Plântulas somáticas em desenvolvimento (28 dias de cultivo). Escala: (—) 0,5 mm.

Nossos resultados indicam que a elevada concentração de CA (3.0 g.L^{-1}) durante um período de tempo maior que 21 dias (tratamento 3E), provavelmente promoveu a adsorção de substâncias essenciais à maturação dos embriões e resultou em uma redução na taxa de diferenciação dos mesmos. Foi possível observar que no 21º dia, este tratamento apresentou a soma de 129 embriões e plântulas, e transcorridos os 28 dias, essa taxa foi reduzida a 74 (Tabela 1).

Ao final do 28º dia, foi observado que o tratamento 1E (0.75 g.L^{-1}) foi o que mais produziu embriões e plântulas durante um período de 7 dias. Porém, na somatória dos vinte e oito dias de experimento, o tratamento 2E (1.5 g.L^{-1}) obteve os

maiores resultados, mostrando a importância da presença de concentrações intermediárias de CA.

A capacidade da cultura responder aos estímulos intrínsecos da maturação é genótipo-dependente, podendo variar significativamente entre diferentes espécies, ou até mesmo variedades. Neste trabalho, a partir de um mesmo genótipo foram individualizados calos E e NE, de acordo com as suas características morfológicas. Esta separação é possível, pois importantes alterações podem ocorrer durante o cultivo *in vitro* de células vegetais, como duplicação cromossomal; fragmentação nuclear, resultando em células multinucleadas; mutações e mitoses anormais (THANH VAN, 1981) e ou variações epigenéticas. Calos compactos e/ou friáveis estão quase sempre associados à presença ou ausência da competência morfogenética, juntamente com a retenção ou liberação no meio de alguns compostos orgânicos (THANH VAN, 1981).

Levando em consideração que o CA tem a capacidade de adsorver componentes do meio (como vitaminas, e demais componentes orgânicos), e até mesmo metabólitos produzidos pelas próprias células, e de liberá-los gradativamente ao meio (NHUT et al., 2001; THOMAS, 2008), a perda da competência embriogênica dos calos NE pode estar associada à ausência no meio, de algum metabólito ou substância que é essencial para a ativação da competência e formação de massas pró-embriogênicas, e ou alterações genéticas e/ou epigenéticas significativas. Essas células, quando jovens, apresentavam a capacidade de sintetizar tais metabólitos, o que promovia a ativação da competência embriogênica que as deixava com características embriogênicas e susceptíveis a tratamentos de maturação. Entretanto, é difícil determinar quais fatores estão diretamente relacionados com a aquisição e/ou perda da capacidade embriogênicas das culturas durante a embriogênese somática em cana-de-açúcar.

Neste contexto, a determinação de parâmetros bioquímicos, como os conteúdos de PAs são de extrema importância para a elucidação dos fatores endógenos que afetam a capacidade embriogênica das culturas e que permitam a progressão da embriogênese somática em cana-de-açúcar.

4.2.2 Metabolismo de poliaminas associados com a maturação

No presente trabalho, foi possível associar os padrões de poliaminas (PAs) com as respostas morfogênicas *in vitro*. No primeiro experimento de maturação, em que foram testados diferentes agentes de maturação (ABA, BAP, PEG-3350 e meio MS sem nenhuma suplementação) foi observado que as PAs livres totais (soma de Put, Spd e Spm livres) foram predominantes às PAs conjugadas totais tanto nos calos E, como nos NE (Figura 15). Em relação às PAs livres totais observou-se que os conteúdos endógenos de PAs nos calos E foram superiores quando comparados com os calos NE, entretanto no controle não foram observadas diferenças expressivas entre os dois tipos de calos (Figura 15A).

Figura 15 - Efeito dos agentes de maturação no conteúdo de poliaminas (PAs) totais (Put, Spd, Spm) em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar. **A)** PAs livres totais (soma de Put, Spd e Spm livres); **B)** PAs conjugadas totais (soma de Put, Spd e Spm conjugadas). **Controle** - meio de cultura MS suplementado com 10 µM de 2,4-D; **MS** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou agentes de maturação; **BAP** - Meio de cultura MS suplementado com 1 µM de BAP; **PEG** - Meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG; **ABA** - Meio de cultura MS suplementado com 20 µM de ABA; **ABA+PEG** - Meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG e 20 µM de ABA. Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

No segundo experimento de maturação, em que foram utilizadas diferentes concentrações de CA, foi observado que o CA afetou consideravelmente os níveis endógenos de PAs livres totais nos calos E e NE (Figura 16), indicando que a suplementação do meio com CA foi capaz de promover mudanças morfogênicas, induzindo alterações no metabolismo de PAs nestas culturas. Em geral os calos NE de cana-de-açúcar apresentaram menores conteúdos de PAs livres que os calos E, quando submetidos aos tratamentos de maturação com CA.

Nos calos E foi observado um aumento no conteúdo endógeno de PAs livres totais, logo no início do experimento, para os tratamentos 0E (0.0 g.L⁻¹ de CA), 1E (0.75 g.L⁻¹ de CA) e 2E (1.5 g.L⁻¹ de CA), com destaque para o tratamento 1E (Figura 16A). O tratamento 3E (3.0 g.L⁻¹ de CA) não apresentou alterações expressivas até o 7º dia de cultivo, porém, após esse período, os níveis de PAs livres totais deste tratamento foi o que apresentou os menores resultados. Os outros tratamentos também apresentaram uma redução acentuada dos níveis de PAs livres totais após o 14º dia e até o 28º dia de cultivo, ficando abaixo do controle (Figura 16A). Essa redução também foi observada no experimento de maturação, em que foram empregados diferentes agentes de maturação mostrando que a capacidade embriogênica dos calos pode estar relacionada com a capacidade de síntese de PAs durante a maturação.

Os calos NE, quando comparados ao controle (MS sem a suplementação de regulador de crescimento e CA), apresentaram um aumento dos níveis endógenos de PAs livres totais (Figura 16B). Com exceção do tratamento 1NE, todos os tratamentos também apresentaram um aumento dos níveis de PAs livres totais logo na primeira semana. Posteriormente, após o 14º dia, o conteúdo endógeno baixou e se manteve praticamente estável até o 28º dia (Figura 16B). Estes resultados indicam que a capacidade embriogênica dos calos pode estar relacionada com a capacidade de síntese de PAs quando as culturas são submetidas ao estresse da maturação.

Figura 16 – Efeito do carvão ativado (CA) no conteúdo de poliaminas (PAs) livres totais (soma de Put, Spd e Spm livres) em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar durante a maturação. **A)** Embriogênico: **0E** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1E** - Meio de cultura MS suplementado com $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de CA; **2E** - Meio de cultura MS suplementado com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CA; **3E** - Meio de cultura MS suplementado com 3 g.L^{-1} de CA. **B)** Não-embriogênico: **0NE** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1NE** - Meio de cultura MS suplementado com $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de CA; **2NE** - Meio de cultura MS suplementado com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CA; **3NE** - Meio de cultura MS suplementado com 3 g.L^{-1} de CA. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

No primeiro experimento, os agentes de maturação promoveram uma variação no conteúdo de PAs livres totais que foi acompanhada por uma alteração no perfil individual das PAs durante a maturação, tanto nos calos E como NE (Figura 17). O menor conteúdo de PAs livres totais nos calos NE, quando submetidas aos tratamentos de maturação, está associado, principalmente à redução no conteúdo das PAs Spd e Spm (Figura 17B).

Figura 17 – Efeito dos agentes de maturação no conteúdo de poliaminas (PAs) livres em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar. **A)** Embriogênico; **B)** Não-embriogênico: **Controle** - meio de cultura MS suplementado com 10 μM de 2,4-D; **MS** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou agentes de maturação; **BAP** - Meio de cultura MS suplementado com 1 μM de BAP; **PEG** - Meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG; **ABA** - Meio de cultura MS suplementado com 20 μM de ABA; **ABA+PEG**- Meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG e 20 μM de ABA. Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

Os calos E mantidos no tratamento BAP foram os que apresentaram os maiores conteúdos de PAs livres (Figuras 15A e 17A). Foi possível verificar neste tratamento a diferenciação e a progressão de embriões somáticos (Figura 9). Outro indicativo de que as poliaminas modulam a maturação de embriões somáticos em cana-de-açúcar é que o tratamento ABA+PEG, que não respondeu expressivamente para a diferenciação de embriões somáticos, apresentou os menores níveis de PAs (inclusive o conteúdo de Put), quando comparados com os demais tratamentos. Esta resposta é importante, pois na via de síntese das PAs, a Put é a molécula precursora para a síntese de Spd e Spm, afetando assim, o metabolismo básico das células e a maturação de embriões somáticos (Figura 3). Em relação à biossíntese de cada uma das PAs nos calos E foi possível verificar uma predominância da produção de Put. A Spm foi a segunda mais produzida seguida de Spd (Figura 17A).

As diferenças nos conteúdos de PAs livres totais foram seguidas por alterações no perfil individual de cada poliamina durante o período de maturação que utilizou a adição de concentrações diferentes de CA. Assim como no experimento anterior (com diferentes agentes de maturação), ao compararmos os níveis de cada poliamina, a PA mais abundante em todos os tratamentos, durante todo o tempo de maturação, tanto em calos E como em NE foi a Put (Figura 18).

Figura 18 – Efeito de carvão ativado (CA) no conteúdo geral dos níveis de PAs livres (PUT; SPD; SPM) em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar durante a maturação. **A)** Embriogênico: **0E** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1E** - Meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L⁻¹ de CA; **2E** - Meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L⁻¹ de CA; **3E** - Meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L⁻¹ de CA. **B)** não-embriogênico: **0NE** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1NE** - Meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L⁻¹ de CA; **2NE** - Meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L⁻¹ de CA; **3NE** - Meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L⁻¹ de CA. Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

Em relação às PAs conjugadas, foi observado que os calos E apresentaram maior conteúdo desta forma de poliaminas, sendo que a Put predominante em todos os tratamentos (Figura 19A). Os tratamentos controle, MS, ABA e ABA+PEG foram os que obtiveram altos níveis de conjugação, e os meios suplementados com BAP e PEG foram os que apresentaram os níveis mais baixos. Os calos NE apresentaram a predominância de Put dentre as PAs conjugadas, principalmente no tratamento

controle. Nos demais tratamentos não foram observados conteúdos expressivos de PAs conjugadas (Figura 19B).

Figura 19 – Efeito dos agentes de maturação no conteúdo de poliaminas (PAs) conjugadas em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar. **A)** Embriogênico; **B)** Não-embriogênico: **Controle** - meio de cultura MS suplementado com 10 µM de 2,4-D; **MS** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou agentes de maturação; **BAP** - Meio de cultura MS suplementado com 1 µM de BAP; **PEG** - Meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG; **ABA** - Meio de cultura MS suplementado com 20 µM de ABA; **ABA+PEG** - Meio de cultura MS suplementado com 3% de PEG e 20 µM de ABA. Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

Segundo Kuznetsov e colaboradores (2006) o aumento no conteúdo de PAs conjugadas pode estar associado com situações de estresse e intensas modificações nas células. Neste contexto, a conjugação de PAs observada principalmente nos calos E pode ser em decorrência do estresse sofrido pelas culturas durante a maturação, em resposta às mudanças no metabolismo celular inerentes desta fase.

Nos calos E, apesar da quantidade elevada de Put em todos os tratamentos com CA, foi possível verificar que há uma redução progressiva desta poliamina durante o período de maturação (Figura 20). No 21º dia o conteúdo de Put foi reduzido a aproximadamente metade em relação ao controle, coincidindo com a formação e progressão dos embriões somáticos (Figura 20A; Tabela 1). Desta forma nos calos E de cana-de-açúcar a diferenciação de embriões somáticos (entre o 14º e 21º dia de cultivo) e a progressão dos embriões à plântulas somáticas clorofiladas (após o 21º dia) ocorrem em condição de baixos níveis de Put e aumento de Spd, quando comparados ao controle. Schons e Brasil (1995) obtiveram resultados similares com culturas embriogênicas de cenoura, em que o aumento da Put na fase de divisão celular foi seguido de um posterior decréscimo que coincide com a formação de embriões somáticos na fase globular.

Figura 20 – Efeito de carvão ativado (CA) no conteúdo endógeno de Put livre presente em calos embriogênicos e não-embriogênicos de cana-de-açúcar durante a maturação. **A)** Embriogênico: **0E** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1E** - Meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L⁻¹ de CA; **2E** - Meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L⁻¹ de CA; **3E** - Meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L⁻¹ de CA. **B)** Não-embriogênico: **0NE** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1NE** - Meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L⁻¹ de CA; **2NE** - Meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L⁻¹ de CA; **3NE** - Meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L⁻¹ de CA. Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

As PAs, Spd e Spm são utilizadas no processo morfogênético propriamente dito (MINOCHA et al. 1991), sendo essenciais para o desenvolvimento dos embriões

somáticos. Neste contexto, a redução de Put durante a evolução embriogenética das culturas, parece estar associada com a intensa utilização da Put para a síntese de Spd, nesta primeira fase da diferenciação celular. Silveira e colaboradores (2006) adicionou ao meio de cultura Spd e Spm e verificou a inibição do crescimento das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, enquanto, que a adição de Put não provocou alteração significativa no crescimento destas culturas quando comparado com o controle.

Os níveis de Spd dos calos E foram semelhantes em todos os tratamentos, exceto no 0E, que foram mais elevados do que o controle, e apresentou nível de Spd praticamente nulo. Isso pode indicar a necessidade da presença de Spd para a maturação de culturas embriogênicas de cana (Figura 21A). Apesar de ter apresentado elevados conteúdos de Spd, os calos NE não apresentaram redução nos conteúdos de Put (Figura 21B). Esta combinação nos calos NE resultou na falta de habilidade para a maturação dos embriões somáticos, indicando a complexidade e a existência de outros fatores que interferem nas respostas das culturas. A síntese de Spm foi praticamente idêntica entre os calos E e NE, inclusive entre os controles (Figura 22).

Figura 21 – Efeito de carvão ativado (CA) no conteúdo endógeno de Spd livre presente em calos embriogênicos e não-embriogênicos de cana-de-açúcar durante a maturação. **A)** Embriogênico: **0E** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1E** - Meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L^{-1} de CA; **2E** - Meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L^{-1} de CA; **3E** - Meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L^{-1} de CA. **B)** Não-embriogênico: **0NE** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1NE** - Meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L^{-1} de CA; **2NE** - Meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L^{-1} de CA; **3NE** - Meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L^{-1} de CA. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

Figura 22 – Efeito de carvão ativado (CA) no conteúdo endógeno de Spm livre presente em calos embriogênicos (E) e não-embriogênicos (NE) de cana-de-açúcar durante a maturação. **A)** Embriogênico: **0E** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1E** - Meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L^{-1} de CA; **2E** - Meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L^{-1} de CA; **3E** - Meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L^{-1} de CA. **B)** Não-embriogênico: **0NE** - Meio de cultura MS sem a suplementação de reguladores de crescimento ou CA; **1NE** - Meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L^{-1} de CA; **2NE** - Meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L^{-1} de CA; **3NE** - Meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L^{-1} de CA. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

Em resumo, nos calos E foi possível observar, nos diferentes tratamentos, que apesar da diferença quantitativa entre as PAs, todos os tratamentos mantiveram

um padrão no perfil de PAs, onde Put>Spm>Spd. No tratamento com diversas concentrações de CA ocorreu uma inversão no conteúdo de Spm e Spd, onde Spd>Spm. O aumento nos conteúdos de Spd nos calos E, em resposta ao tratamento de maturação com CA, pode ser uma das hipóteses para a eficiência deste composto na formação dos embriões somáticos. Elevadas concentrações de Spd durante a maturação de embriões somáticos também foi observado por Nieves e colaboradores (2003), em que o aumento nos níveis de Spd encontrados em calos E foi diretamente correlacionado a embriogênese somática em cana-de-açúcar. A partir de nossos resultados foi possível concluir que a embriogênese somática em calos E de cana-de-açúcar é caracterizada por um aumento do conteúdo endógeno de Spd acompanhado por uma redução nos níveis de Put (Figura 18).

Como foi discutido anteriormente, a progressão dos embriões somáticos nos calos E foi acompanhada pela redução no conteúdo endógeno de Put na cultura. Nos calos NE, em que não propiciou a formação de embriões somáticos, não foi observada a redução no conteúdo de Put. Sabe-se que Put em excesso é tóxica às células, o que pode ter resultado no estresse oxidativo sofrido pelos calos NE. Um dos danos causados por determinados fatores de estresse é a produção de radicais livres, essencialmente, as espécies reativas de oxigênio (ROS), e que são responsáveis por danos, muitas vezes irreversíveis (CHAGAS, 2007). Os radicais livres são moléculas instáveis e que rapidamente sofrem auto-oxidação, produzindo radicais superóxidos, hidroxilas, peróxidos e oxigênio singleto. Estes por sua vez, são altamente reativos com os lipídeos das membranas celulares, promovendo sua peroxidação (CHAGAS, 2007).

A geração de espécies ROS constitui uma resposta primária da planta ao estresse biótico ou abiótico, caracterizando um dano oxidativo (ASADA, 2006). Vale lembrar que tais moléculas estão envolvidas no metabolismo normal do vegetal, como fotossíntese e respiração (MITTLER, 2002). Contudo, em condições normais de crescimento, essas espécies químicas mantêm-se em baixos níveis (CHAGAS, 2007). Assim, essas espécies reativas podem ser vistas como indicadores celulares de estresse e como mensageiros secundários envolvidos na via de transdução de sinais na resposta ao estresse (MITTLER, 2002).

Já é bem conhecida a participação das PAs na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Baixos níveis de PAs, resultam na inibição do

crescimento radicular, divisão celular, síntese de DNA, biomassa requerida e altura de plântulas (BASSO et al., 2007). Em nosso trabalho, partindo de calos E, foi possível verificar que há uma tendência de diminuição nos níveis endógenos de PAs, a medida que há o desenvolvimento completo do embrião até a formação de uma plântula completa (Figura 23). Foi observado alterações nos níveis de PAs nos diferentes tecidos e culturas de cana-de-açúcar analisados.

Figura 23 – Conteúdo endógeno de PAs livres (Put, Spd, Spm) presente em diferentes explantes de cana-de-açúcar. **Calo NE**: calo não-embriogênico mantido em meio MS suplementado com 2,4-D; **Calo E**: calo embriogênico mantido em meio MS suplementado com 2,4-D; **P/E**: plântulas/embriões formados após tratamento de maturação com CA (1.5g.L⁻¹); e **PJ**: (plântulas jovens) indivíduo completo de cana-de-açúcar cultivado *in vitro*. Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

Como já descrito anteriormente, os calos NE apresentam baixos níveis de PAs livres quando comparados com calos E. Ambos apresentam um mesmo perfil, onde o conteúdo de Put>Spd>Spm. O acúmulo de Put nos calos E representa a fase de crescimento linear onde as células se multiplicam rapidamente, indicando que a biossíntese de PAs ocorreu simultaneamente à condição fisiológica de intenso metabolismo, no qual a divisão celular ou a formação de órgãos estaria diretamente correlacionada (BASSO et al., 2007). Já as plântulas/embrião apresentam quantidades de PAs totais similares aos calos NE, porém com um perfil invertido

(Put<Spd<Spm), demonstrando que ocorreu uma metabolização de Put para crescimento e diferenciação dos tecidos da planta (Figura 23). Resultado semelhante foi obtido por Savithramma e Swamy (1989), onde ao final da germinação de sementes de *Arachis hypogea*, ocorreu uma diminuição do conteúdo de todas as PAs. As PAs, especialmente a Spd, são encontradas geralmente em abundância em órgãos jovens não senescentes, e diminui a medida que o tecido envelhece (RODRÍGUEZ et al., 2000).

Nos estudos das variações de PAs relacionadas com as respectivas respostas morfogênicas, muitas vezes a razão de PAs $[Put.(Spd+Spm)^{-1}]$ tem se mostrado mais importante e informativa para a determinação da capacidade embriogênica e posterior regeneração de plantas do que os níveis absolutos das PAs (SHOEB et al., 2001).

Neste contexto, calos NE submetidos aos tratamentos com CA apresentaram uma razão de PAs maior que os calos E. Em resumo este resultado mostra que a concentração relativa da Put no total das PAs analisadas é maior nos calos NE que nos calos E. Através desta resposta podemos reformar a conclusão de que é necessária uma redução nos teores relativos de Put para a progressão do desenvolvimento da embriogênese somática em cana. Esta hipótese foi suportada pela análise da razão de PAs em plântula/embrião e plantas jovens, em que foi observada uma razão de PAs menor do que as observadas nos calos NE (Figura 24), indicando que uma baixa razão de PAs pode estar correlacionada com o desencadeamento da morfogênese em cana.

Figura 24 – Análise da razão de PAs [Put/(Spd+Spm)] em diferentes tecidos e culturas de cana-de-açúcar de cana-de-açúcar. **MNE** – calos não-embriogênicos em meio de multiplicação MS suplementado com 2,4-D (10 mM); **0NE** – meio de cultura sem a suplementação de CA ativado ou regulador de crescimento; **1NE** – meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L⁻¹ de CA; **2NE** – meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L⁻¹ de CA; **3NE** – meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L⁻¹ de CA; **ME** – calos embriogênicos em meio de multiplicação MS suplementado com 2,4-D (10 mM); **0E** – meio de cultura sem a suplementação de CA ativado ou regulador de crescimento; **1E** – meio de cultura MS suplementado com 0.75 g.L⁻¹ de CA; **2E** – meio de cultura MS suplementado com 1.5 g.L⁻¹ de CA; **3E** – meio de cultura MS suplementado com 3.0 g.L⁻¹ de CA; **P/E** – plântula/embrião obtida em meio de maturação 2E; **PJ** – plântula jovem obtida em meio de maturação 2E.

Alguns trabalhos demonstram que o processo de maturação também é caracterizado pela expansão celular (WEIGELT et al., 2008), no qual as células em alongamento apresentam uma menor relação $\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}$, ocasionada pelo incremento nos níveis endógenos de Spd e Spm (KAKKAR et al., 2000).

Silveira (2004) verificou que a razão de PAs diminuiu gradativamente durante a progressão da embriogênese somática e do desenvolvimento do embrião zigótico em *Araucaria angustifolia*. Em embriões somáticos de *Oryza sativa* a redução na razão de PAs foi mais importante para a maturação dos embriões somáticos que os níveis absolutos das PAs (SHOEB et al., 2001).

Altas concentrações de PAs estão normalmente presentes no tecido vegetal em crescimento ativo e durante os estádios da embriogênese somática (KUZNETSOV et al., 2006). Uma forte correlação positiva entre embriogênese

somática e aumento do conteúdo de PAs foi demonstrada em culturas celulares de *Daucus carota* onde a inibição da biossíntese de PAs bloqueou completamente a embriogênese somática nesta espécie (PAUL et al., 2009).

As alterações no conteúdo de PAs podem estar relacionadas à fase e/ou etapa de desenvolvimento da embriogênese somática (MINOCHA et al., 2004; PAUL et al., 2009). Calos E apresentam uma maior atividade metabólica que calos NE, principalmente em relação a compostos nitrogenados (proteínas, prolina livre, atividade proteolítica e conteúdo de PAs), esta alta atividade metabólica pode ser a responsável pelos eventos moleculares que conduzem ao processo de embriogênese somática em cana (Nieves et al., 2003).

Neste contexto, a Put pode ser considerada um fator chave na indução da embriogênese somática (PAUL et al., 2009). O acúmulo de Put está relacionado ao estresse, e pode ter uma função adaptativa (CAMARA et al, 1998), porém, uma alta concentração desta PA pode ser tóxica por provocar o aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio e de radicais livres durante sua oxidação, como já mencionado anteriormente. Entretanto, a manutenção dos teores de Put é uma condição necessária para o desenvolvimento vegetal, uma vez que a alteração no conteúdo desta poliamina pode representar uma alteração na síntese das PAs Spd e Spm (SCHONS e BRASIL, 1995).

Alguns trabalhos mostram que a administração exógena de Put resultou em um aumento da embriogênese somática em algodão (SAKHANOKHO et al., 2005) e em *Coffea canephora* (KUMAR et al., 2008). Silveira et al. (2006) observou que a suplementação de meio líquido com as PAs Spd e Spm resultou em uma redução de crescimento de culturas embriogênicas e culminou na diferenciação morfogênética de massas pró-embriogênicas. A adição de Put ao meio de cultura tem sido associada com a multiplicação de embriões em estádios mais avançados de desenvolvimento (STEINER et al., 2008).

Neste contexto, a predominância da Put nos calos NE pode estar relacionada com a rápida oxidação dos calos NE quando submetidos aos tratamentos de maturação. Os baixos níveis de Spd e Spm também indicam uma baixa taxa de divisão celular nestes tecidos, já que estas PAs são necessárias para a transição da fase G1 para S no ciclo celular (CROZIER et al., 2002).

A maturação de embriões somáticos em calos E de cana-de-açúcar esteve associada com a retirada do 2,4-D e à suplementação do meio de cultura com agentes de maturação e/ou CA. Diversos trabalhos associam a manifestação da competência embriogenética à diminuição ou até mesmo à retirada de 2,4-D (ZIMMERMAN, 1993; CECCARELLI et al., 2000; JIMÉNEZ, 2001). A utilização de auxinas fortes, como o 2,4-D, tem comprovada eficiência nas fases de indução e manutenção de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (LAKSHMANAN et al., 2006). Com a retirada da auxina do meio de cultura, as culturas embriogênicas entram num ciclo de maturação, caracterizado pelo uso de agentes de maturação (STEINER et al., 2008).

A habilidade de calos embriogênicos para a diferenciação em embriões somáticos indica que existe uma expressão diferencial de genes entre células E e NE (OROPEZA et al., 2001). Santa-Catarina e colaboradores (2004) verificaram que agregados celulares de *Ocotea catharinensis* mostraram expressão homóloga de SERK. O gene *DcSERK* (Receptor quinase da embriogênese somática) foi um dos primeiros genes descritos relacionado à competência embriogênica em cultura de tecidos de cenoura (*Daucus carota*) (SCHMIDT et al., 1997). A expressão homóloga de *SERK* não apenas marca células competentes a formarem embriões, mas também está envolvido em conferir esta competência embriogênica, e pode ser um componente de uma rota de sinalização da embriogênese (SANTA-CATARINA et al., 2004).

Uma das abordagens moleculares para a investigação do mecanismo de percepção e transdução de sinais de PAs em plantas sob condições de estresse é a análise bioquímica e fisiológica de mutantes com diferentes fenótipos, metabolismo e sensibilidade às PAs, associado ou não com o uso de inibidores da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese das PAs (KUZNETSOV et al., 2006). Bertoldi et al. (2004) verificou que durante a embriogênese somática de *Vitis vinifera* a atividade da ODC (ornitina descarboxilase) foi superior a da ADC (arginina descarboxilase) e que os níveis de expressão dos genes de ODC e SAMDC (S-adenosil-metionina descarboxilase) estavam correlacionados com a atividade das enzimas de biossíntese de Put e Spd nos estádios iniciais da embriogênese. A ausência da correlação entre os conteúdos de PAs livres, a atividade das enzimas de biossíntese e os níveis de expressão dos estádios tardios da embriogênese em plantas

regeneradas pode resultar da ativação de sistemas regulatórios celulares tais como degradação oxidativa de PA e formação de conjugados (KUZNETSOV et al., 2006).

Neste sentido, um marcador bioquímico como a concentração endógena de PAs específicas, ou a razão de PAs, pode ser útil para identificar essa expressão diferencial de genes antes mesmo de mudanças morfológicas aparentes (OROPEZA et al, 2001).

Finalmente, este trabalho mostrou que a maturação de embriões somáticos de cana-de-açúcar pode estar relacionada com o aumento dos níveis da poliamina Spd e redução de Put, indicando a importância do metabolismo de PAs na determinação da competência de culturas embriogênicas e no desenvolvimento de embriões somáticos de cana-de-açúcar.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho foi possível chegar às seguintes conclusões sobre o sistema de embriogênese somática em cana-de-açúcar:

- A adição de CA ao meio de maturação foi essencial para a indução da competência embriogênica e evolução morfogenética de embriões somáticos e conversão em plântulas em calos E de cana-de-açúcar;
- A frequência de diferenciação de embriões somáticos, a partir de calos E de cana-de-açúcar, foi maior para o tratamento de maturação com a adição de 1.5 g.L^{-1} de CA;
- A ausência da formação de embriões somáticos e a perda da competência embriogênica dos calos NE pode estar associada à incapacidade de redução do conteúdo de Put, quando submetidos à maturação.
- A maturação de embriões somáticos em calos E de cana-de-açúcar é caracterizada pelo aumento do conteúdo endógeno de Spd acompanhado por uma redução nos níveis de Put.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível verificar as alterações que ocorrem nos níveis endógenos de PAs, durante o processo de maturação de calos E de cana-de-açúcar. Os calos E responderam melhor aos tratamentos onde houve a adição de CA, sendo assim, podemos considerar que o uso do CA adicionado ao meio de cultura foi de fundamental importância na promoção da embriogênese somática de cana. As diferenças no conteúdo endógeno de PAs, encontradas entre calos E e NE de cana-de-açúcar, indicam a complexidade e a existência de outros fatores que podem interferir tanto na competência embriogenética, como nas respostas das culturas a tratamentos de maturação. Contudo, novas análises se fazem necessárias para identificar como o CA atua efetivamente nas rotas de síntese e degradação das PAs e na aquisição da capacidade embriogênica das culturas.

Visando compreender os processos metabólicos de PAs durante a maturação de cana-de-açúcar, análises ao nível celular, bem como estudos que avaliem o perfil dos níveis de aminoácidos, principalmente daqueles envolvidos no metabolismo de PAs, como arginina (Arg), ornitina (Orn), metionina (Met), citrulina (Cit) e ácido γ -aminobutírico (GABA), seriam de grande importância.

Analisando a rota biossintética das PAs nos vegetais, é possível constatar que as PAs são sintetizadas a partir dos aminoácidos Arg e Orn, formando a amina Put, que é a precursora da diamina Spd e da triamina Spm, por adições sucessivas de grupamentos aminopropil, doados pela enzima adenosil-metionina descarboxilase (AdoMetDC). Uma rota alternativa para a produção de Spd e Spm, se dá através da utilização do aminoácido Met. Finalmente, a degradação oxidativa das PAs pelas amino-oxidases produzem DAP (diaminopropano) e GABA. Além da rota biossintética direta descrita acima, a Put pode também ser sintetizada pela descarboxilação da arginina, produzindo agmatina, esta é catalisada pela arginina descarboxilase (ADC) (RODRÍGUEZ et al., 2000). A agmatina é então hidrolisada a N-carbamoil putrescina (NCP) pela agmatina iminohidrolase (RODRÍGUEZ et al., 2000). A Put então, pode se produzida diretamente a partir do carbamoil do NCP, composto metabolizado em CO_2 e NH_3 pela NCP amido hidrolase. Um mecanismo alternativo da síntese de Put via uma enzima multifuncional, a putrescina sintase,

propõe que a agmatina é transformada em NCP e então convertida a Put e citrulina (RODRÍGUEZ et al., 2000).

Fim (2009) observou que culturas E de cana-de-açúcar da variedade CB45-3, mantidas em meio de maturação, apresentaram um acúmulo de aminoácidos totais nos sete primeiros dias, seguido por um decréscimo nos dias seguintes, o que sugere o envolvimento dos aminoácidos no crescimento e diferenciação dos embriões. Sendo assim, a análise dos conteúdos endógenos de aminoácidos envolvidos na rota biossintética das PAs poderia fornecer informações valiosas sobre a síntese e/ou degradação destas biomoléculas durante o processo de maturação de calos E e NE, e as relações intra e interespecíficas do metabolismo dessas culturas, envolvendo a biossíntese de poliaminas e aminoácidos.

Outra perspectiva de estudos futuros, com base nas análises conjuntas entre os perfis de aminoácidos e PAs durante a maturação, seria a adição de certos aminoácidos, PAs ou inibidores de sua síntese ao meio de maturação, onde os resultados obtidos poderiam promover uma eficiência do processo de embriogênese somática. Dias et al. (2009) verificaram que ao acrescentar um inibidor de biossíntese das PAs Spd e Spm, o metil-glioxalbis-guanilhidrazona (MGBG), e paralelamente, adicionar as PAs Spd e Spm ao meio de cultivo de duas espécies de *Passiflora*, ocorreu a elevação dos níveis de etileno, sugerindo que a adição de inibidores ou o produto final da atividade da enzima SAM descarboxilase pode favorecer a biossíntese do etileno. Neste contexto, estudos enzimáticos poderiam também ser utilizados a fim de se estabelecer qual rota de biossíntese é ativada durante a embriogênese somática de calos E e NE de cana-de-açúcar, e com isso estabelecer protocolos que otimizem a produção de embriões somáticos para esta cultura.

Diversos estudos têm analisado as diferentes relações morfogênicas usando alguns indicadores como os níveis de etileno e PAs (DIAS et al., 2009). Esse tipo de análise poderia fornecer uma melhor compreensão dos eventos que ocorrem em calos E que perdem a competência tornando-se NE, e conseqüentemente, não respondendo aos tratamentos de maturação, como o que ocorreu neste trabalho. Um estudo realizado por Steinmacher et al. (2007) sobre a influência da adição de AgNO_3 , um inibidor de etileno, ao meio de cultura mostrou que este composto

originou uma redução da biossíntese deste gás, e promoveu uma eficiência da embriogênese somática e competência embriogenética em *Bactris gasipaes*.

Neste sentido, estudos comparativos, além de importantes para os estudos básicos na busca de informações sobre os fatores que afetam a embriogênese somática, são de fundamental importância para a otimização e utilização da embriogênese somática como metodologia alternativa de propagação, conservação de germoplasma, e como ferramenta em futuros programas de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ARENCIBIA, A. D.; CARMONA, E. R.; TÉLLEZ, P.; CHAN, M. T.; YU, S. M.; TRUJILLO, LE; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, v. 7, p. 213-222, 1998.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141, p. 391-396, 2006.

ASSIS, P. C. O.; LACERDA, R. D.; AZEVEDO, H. M.; NETO, J. D.; FARIAS, C. H. A. Respostas dos parâmetros tecnológicos da cana-de-açúcar a diferentes lâminas de irrigação e adubação. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, p. 1519-1531.

ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 1-35, 1993.

BAIS, H. P.; SUDHA, G.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of putrescine, silver nitrate and polyamine inhibitors on the morphogenetic response in untransformed and transformed tissue of *Cichorium intybus* and their regenerants. **Plant Cell Report**, v. 20, p. 547-555, 2001.

BARON, K.; STASOLLA, C. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 44, n. 5, p. 384-395, 2008.

BASSO, L. H. M.; LIMA, G. P. P.; GONÇALVES, A. N.; VILHENA, S. M. C.; PADILHA, C. C. F. Efeito do alumínio no conteúdo de poliaminas livres e atividade da fosfatase ácida durante o crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* *in vitro*. **Scientia Forestalis**, n. 75, p. 9-18, 2007.

BERTOLDI, D.; TASSONI, A.; MARTINELLI, L.; BAGNI, N. Polyamines and somatic embryogenesis in two *Vitis vinifera* cultivars. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 657-666, 2004.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2^a ed., New York: Plenum Press; 1994. 445 p.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v. 140, p. 103-125, 1999.

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; TORNÉ, J. M.; RODRIGUEZ, P.; SANTOS, M. A. Efeito da putrescina e do estresse salino em calos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 2, p. 153-156, 1998.

CECCARELLI, N.; MONDIN, A.; CURADI, M.; LORENZI, R.; SCHIAVO, F. L. Auxin metabolism and transport in an embryogenic cell line of *Daucus carota* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 17-23, 2000.

CHAGAS, R. M. **Alterações forossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.

CHANDLER, P.; ROBERTSON, M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 113–141, 1994.

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, p. 385-391, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB - **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar** – Safra 2009/ 2010 - Terceiro levantamento – Dezembro/2009. Brasília: CONAB, 2009. 16 p.

COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO-COPERSUCAR. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.copersucar.com.br>>. Acesso em: 18 de out. 2009.

COOKE, T. J.; RACUSEN, R. H.; COHEN, J. D. The role of auxin in plant embryogenesis. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1494-1495, 1993.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, D. R. L. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. 3. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2002. p. 850-929.

CRUZ, M. A. L.; SILVA, A. D. C.; VEIGA, C. F. M.; SILVEIRA, V. Biofábricas para produção de mudas por micropropagação: estratégia para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar no Rio de Janeiro. **Inter Science Place**, v. 5, p. 1-18, 2009.

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

DE VITA, A. M. **Indução e controle da embriogênese somática em cultivares de cana-de-açúcar**: aspectos fisiológicos e bioquímicos. Campos dos Goytacazes: Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade, Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008. 41 p.

DIAS, L. L. C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; PIERUZZI, F. P.; FLOH, E. I. S. Polyamines, amino acids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. **Seed Science and Technology**, v. 37, p. 1-5, 2009.

DUMAS, E.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants-influence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 231-235, 1995.

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. 201-208, 2003.

FEIRER, R. P. The biochemistry of conifer embryo development: amino acids, polyamines and storage proteins. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Eds.). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 317-336.

FILIPPI, S. B.; DA GLORIA, B. A.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.

FIM, L. G. **Metabolismo de proteínas, aminoácidos e carboidratos associados com a maturação de culturas embriogênicas de cana-de-açúcar**. Campos dos Goytacazes: Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade, Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009. 38 p.

FREITAS, V. G.; LACORTE, C.; SACHETTO-MARTINS, G.; KRUL, W.R, OLIVEIRA DE, NEVES LJ, MANSUR E. Identification of competent cells for *Agrobacterium*-transformation and *in vitro* regeneration in peanut leaf and cotyledon explants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, p. 157-167, 1997.

GAJ, M. D.; TROJANOWSKA, A.; UJEZAC, A.; MEDREK, M.; KOZIOL, A.; GARBACIAK, B. Hormone-response mutants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. impaired in somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 49, p. 183-197, 2006.

GANDONOU, C.; ERRABII, T.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; CHIBI, F.; SENHAJI, N. S. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 11, p. 1250-1255, 2005.

GARCIA, G.; CIDADE, D.; CASTELLAR, A.; LIPS, A.; MAGIOLI, C.; CALLADO, C.; MANSUR, E. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type of growth regulator. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 181-190, 2007.

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

GEORGE, E. F.; MICHAEL, A. H.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, The Background. ed. 3. Basingstoke: Springer, 2008. 501 p. v. 1.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Plant Biology**, v. 5, p. 122-127, 2001.

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

GUTMANN, M.; VON ADERKAS, P.; LABEL, P.; LELU, M. A. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 305, p. 1905-1917, 1996.

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 tecido de plantas**. Brasília: Embrapa, 1990. p. 203-212.

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

INZÉ, D. Plant biotechnology helps to build a sustainable economy. **Biotechnology**, v. 16, p. 109-111, 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, n. 2, p. 196-223, 2001.

KAKKAR, R. K.; NAGAR, P. K.; AHUJA, P. S.; RAI, V. K. Polyamines and plant morphogenesis. **Plant Physiology**, v. 43, p. 1-11, 2000.

KUMAR, V.; GIRIDHAR, P.; CHANDRASHEKHAR, A.; RAVISHANKAR, G. A. Polyamines influence morphogenesis and caffeine biosynthesis *in vitro* cultures of *Coffea canephora* P. ex Fr. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 217-223, 2008.

KURAKAWA, T.; UEDA, N.; MAEKAWA, M.; KOBAYASHI, K.; KOJIMA, M.; NAGATO, Y.; SAKAKIBARA, H.; KYOZUKA, J. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. **Nature**, v. 445, p. 652-655, 2007.

KUZNETSOV, V. V.; RADYUKINA, N. L.; SHEVYAKOVA, N. I. Polyamines and Stress: Biological Role, Metabolism, and Regulation. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 53, n. 5, p. 583-604, 2006.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. L. P.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. In **Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, p. 345-363, 2005.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P. L.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf cultures. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1007-1015, 2006.

LAKSHMANAN, P. Invited review addendum: Somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review “Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities,” In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41(4): 345–363; 2005. In **Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 201-205, 2006.

LAMEIRA, A. O.; PINTO, J. E. B. P.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; CARDOSO, M. G. Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento de segmento nodal de *Cordia verbenacea* L. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 189-192, 1997.

LEE, T. S. G.; BRESSAN, E. A.; CORRÊA-DA-SILVA, A. D.; LEE, L. L. Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 2032-2040, 2007.

LIMA, M. A. C.; GARCIA, R. O.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 73-77, 2001.

LINACERO, R.; LÓPEZ-BILBAO, M. G.; VÁSQUEZ, A. M. Expression of different abscisic acid-responsive genes during somatic embryogenesis (*Saccharum officinarum*). **Protoplasma**, v. 1, p. 199-204, 2001.

LIU, M. C. Sugarcane. In: SHARP, W. H.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan Publisher Co., 1983. p 572–605. v. 2.

LOWE, J. W.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; BLUNDY, K. S. A study of some factors affecting *Agrobacterium* transformation and plant regeneration of *Dendrothema grandiflora* Tzvelev. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 171-180, 1993.

MARCHIORI, L. F. S. **Influência da época de plantio e corte na produtividade da cana-de-açúcar**. 275 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

MARSONI, M.; BRACALE, M.; ESPEN, L.; PRINSI, B.; NEGRI, A. S.; VANNINI, C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 347-356, 2008.

MINOCHA, R.; MINOCHA, S. C.; LONG, S. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v. 40, p. 572-580, 2004.

MINOCHA, S. C.; PAPA, N. S.; JAMAL KHAN, A.; SAMUELSEN, A. I. Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. II Effects of Methylglyoxal bis (guanylhyazone). **Plant and Cell Physiology**, v. 3, n. 32, p. 395-402, 1991.

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

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

NIEVES, N.; SEGURA-NIETO, M.; BLANCO, M. A.; SANCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J. L.; CASTILLO, R. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v. 39, p. 343-345, 2003.

NHUT, D. T.; LE, B. V.; FUKAI, S.; TANAKA, M.; VAN, K. T. T. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. **Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 59-65, 2001.

OROPEZA, M.; MARCANO, A. K.; GARCÍA, E. Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharum* sp.). **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v. 37, p. 211-216, 2001.

OWEN, H. R.; WENGERD, D.; MILLER, A. R. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 583-586, 1991.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. Effect of charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. **Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 135-141, 1999.

PAUL, A.; MITTER, K.; RAYCHAUDHURI, S. S. Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, p. 303-311, 2009.

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; BANDUPRIYA, H. D. D.; YAKANDAWALA, D. M. D.; WEERAKOON, L. K. Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 293-302, 2008.

RICHARD, D.; LESCOT, M.; INZÉ, D.; DE VEYLDER, L. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 167-176, 2002.

ROCK, C. D.; QUATRANO, R. S. Lanthanide ions are agonists of transient gene expression in rice protoplasts and act in synergy with ABA to increase *Em* gene expression. **Plant Cell Reports**, v. 15, n. 5, p. 371-376, 1996.

RODRÍGUEZ, C. W.; DE ARMAS, R.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Changes in free and conjugated polyamines during starvation of sugarcane juices as analyzed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 531-541, 2000.

RODRÍGUEZ, S.; MONDEJAR, C.; RAMOS, M. E.; DÍAZ, E.; MARIBONA, R.; ANCHETA, O. Sugarcane somatic embryogenesis: a scanning electron microscopy study. **Tissue & Cell**, v. 28, n. 2, p. 149-154, 1995.

SAKHANOKHO, H. F.; OZIAS-AKINS, P.; MAY, O. L.; CHEE, P. W. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 91-95, 2005.

SALAJOVA, T.; SALAJ, J.; KORMUTAK, A. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. **Plant Science**, v. 145, n. 1, p. 34-40, 1999.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L. R.; DORNELAS, M. C.; VIANA, A. M.; FLOH, E. I. S. *SERK* Gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 53-61, 2004.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; SCHERER, G. F. E.; FLOH, E. I. S. Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 91-101, 2007.

SARJALA, T.; TAULAVUORI, K.; SAVONEN, E. M.; EDFAST, A. B. Does availability of potassium affect cold hardening of Scots pine through polyamine metabolism? **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 56-62, 1997.

SAVITHRAMMA, N.; SWAMY, P. M. Quantitative changes of polyamines and activity of ADC in developing and germinating seeds of two groundnut (*Arachis hypogaea*) genotypes. **Annals of Botany**, v. 64, p. 337-341, 1989.

SCHMIDT, E. D. L.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A. J.; DE VRIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v. 124, p. 2049-2062, 1997.

SCHLAPPI, M.; HOHN, B. Competence of immature maize embryos for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **The Plant Cell**, v. 4, p. 7-16, 1992.

SCHONS, J.; BRASIL, G. Poliaminas na embriogênese somática em cenoura (*Daucus carota* L.). **Scientia Agricola Journal**, v. 52, n. 3, p. 534-536, 1995.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICROS E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE-MG. **Ponto de partida para início de negócio** – Cultivo de cana-de-açúcar. Belo Horizonte: SEBRAE-MG, 2006, 57 p.

SHOEB, F.; YADAV, J. S.; BAJAJ, S.; RAJAM, M. V. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Science**, v. 160, p. 1229–1235, 2001.

SHOJI, M.; SATO, H.; NAKAGAWA, R.; FUNADA, R.; KUBO, T.; OGITA, S. Influence of osmotic pressure on somatic embryo maturation in *Pinus densiflora*. **Journal of Forest Research**, v. 11, p. 449-453, 2006.

SILVEIRA, V.; BALBUENA, T. S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regulation**, v. 44, n. 2, p. 147-156, 2004a.

SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2004b.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T. S.; MORAES, F. M. S.; RICART, C. A. O.; SOUSA, M. V.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 52, p. 101-104, 2008.

SILVEIRA, V. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da embriogênese zigótica e somática em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. e em *Pinus taeda* L.** 106 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N. N.; SCHERER, G. F. E.; HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Polyamines effects on the endogenous polyamines contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, v. 171, p. 91-98, 2006.

SLOCUM, R. D.; GALSTON, A. W. Changes in polyamines associated with post fertilization and development in tobacco ovary tissue. **Plant Physiology**, v. 79, p. 336-343, 1985.

SOUZA, S. L. **Análise do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsiva à micorriza arbuscular.** 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

STALS, H.; INZÉ, D. When plant cells decide to divide. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 359-364, 2001.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J. B. R.; BALBUENA, T. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W.; FLOH, E. I. S.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* Biotechnology-Review. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, p. 20-28, 2008.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P. Polyamines effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue Organs and Cultures**, v. 89, p. 55-62, 2007.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v. 43, p. 124-132, 2007.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tissue and Organs Cultures**, v. 74, p. 15-35, 2003.

SVOBODOVÁ, H.; ALBRECHTOVA, J.; KUMSTYROVA, L.; LIPAVSKA, H.; VAGNER, M.; VONDRAKOVA, Z. Somatic embryogenesis in Norway spruce: anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 209-221, 1999.

TAUTORUS, T. E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1873-1899, 1991.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Santa-Maria: UFRGS, 2005. 182 p.

THANH VAN, K., M. T. Control of morphogenesis in *in vitro* cultures. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 32, p. 291-311, 1981.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 618-631, 2008.

THORPE, T. A. **In Vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 557 p.

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

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR-UNICA. **Setor Sucroenergético – Histórico**. 6 - Cultivo da cana hoje. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 28 de dez. 2009.

VAN WINKLE, S. C.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and active carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. **Plant Cell Report**, v. 21, p. 1175-1182, 2003.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 1–7, 2001.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; SOUZA, G. M.; SILVA, A. M. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v. 13, p. 2725-2735, 2003.

VON ARNOLD, S.; 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.

WALLACE, H. M.; FRASER, A. V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochemical Journal**, v. 376, p. 1-14, 2003.

WEIGELT, K.; KUSTER, H.; RADCHUK, R.; MULLER, M.; WEICHERT, H.; FAIT, A.; FERNIE, A. R.; SAALBACH, I.; WEBER, H. Increasing amino acid supply in pea embryos reveals specific interactions of N and C metabolism, and highlights the importance of mitochondrial metabolism. **The Plant Journal**, v. 55, p. 909-926, 2008.

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