

**Ludmila Grechi Fim**

**ESTUDO DO CRESCIMENTO CELULAR EM CULTURAS  
EMBRIOGÊNICAS E NÃO-EMBRIOGÊNICAS  
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eny  
lochevet Segal Floh

Versão original

**São Paulo  
2012**

## RESUMO

Fim, LG. Estudo do crescimento celular em culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar. [dissertação(Mestrado em Biotecnologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

A cana-de-açúcar é uma das culturas com maior importância econômica mundial, sendo responsável por aproximadamente 70% do açúcar produzido, além de ser uma fonte cada vez mais importante de biocombustível. O Brasil é, na atualidade, o maior produtor e exportador mundial de açúcar e álcool derivados de cana-de-açúcar, sendo São Paulo o Estado de maior produção nacional. Devido ao seu destaque global, atualmente muitos estudos têm sido direcionados para gerar melhorias na cana-de-açúcar, principalmente por meio de biotecnologias. A integração de técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos e a engenharia genética tem proporcionado novas oportunidades para a produção de cultivares geneticamente superiores, com características desejadas. Das técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática possui características atraentes, como a capacidade de produzir rapidamente um grande número de plantas e a formação de embriões somáticos de forma eficiente, regenerando plantas saudáveis e vigorosas. Neste contexto, esta pesquisa de mestrado teve como objetivo estudar aspectos bioquímicos da fase de multiplicação celular, que antecede a formação de embriões somáticos, com o intuito de adquirir conhecimentos sobre o desenvolvimento das células de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280, para um melhor entendimento da embriogênese somática nessa espécie. Com esse intuito, culturas embriogênicas (CE) e não-embriogênicas (CNE) foram estabelecidas, subcultivadas e monitoradas. Foram analisados o crescimento celular e os perfis de carboidratos, de amido, de poliaminas e de proteínas totais. Com o estabelecimento das curvas de crescimento de CE e CNE, observamos que ambas as culturas tiveram o máximo de seu crescimento aos 24 dias de cultivo, momento em que iniciaram uma redução de sua matéria fresca (MF). O maior incremento em MF foi encontrado em CE. Na análise de carboidratos foi demonstrado que a sacarose é o carboidrato predominante em CE enquanto que em CNE a glicose foi observada em maior quantidade. Em CE os conteúdos de frutose e glicose variam simultaneamente e obedecendo o mesmo padrão de variação, demonstrando a relação entre seus metabolismos. Com a quantificação de amido encontramos as maiores concentrações em CNE, o que pode demonstrar que CE utilizam a energia originada da degradação de amido para capacitar suas células a desenvolver a embriogênese somática. Já com a quantificação de proteínas totais observamos conteúdos significativamente maiores em CE, pois proteínas de reserva para desenvolvimento do embrião provavelmente estão sendo acumuladas. Por fim, a análise de poliaminas (PAs) livres mostrou maiores quantidade de PAs em CNE, sendo a espermina predominantes em CE, enquanto que em CNE a putrescina foi observada em maior concentração. Foi demonstrado um menor valor de razão entre PAs [Razão PA= Put/(Spd+Spm)] em CE, o que também se relaciona a sua capacidade de desenvolver a embriogênese somática.

**Palavras-Chave:** Cana-de-açúcar. Carboidratos. Amido. Proteínas. Poliaminas.

## ABSTRACT

Fim, LG. Study of cell growth in embryogenic and non-embryogenic cultures of sugarcane. [Master's thesis (Biotechnology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

The sugarcane is one of the most economically important crops of the world, accounting for approximately 70% of sugar produced, in addition to being an increasingly important source of biofuel. Brazil is currently the largest producer and exporter of sugar and ethanol derived from sugarcane, and the State of São Paulo contributes with the greatest share. Due to the global importance, many studies are directed to improve sugarcane production, mainly through biotechnology. The integration of biotechnology techniques, such as tissue culture and genetic engineering has provided new opportunities for the production of genetically superior cultivars with desired traits. Tissue culture and somatic embryogenesis techniques have attractive features, like the ability to quickly produce a large number of plants and the efficient formation of somatic embryos, affording to regenerate healthy and vigorous plants. In this context, this master's research investigates biochemical aspects of cell multiplication phase, which precedes the formation of somatic embryos in order to gain knowledge of the development of cells of sugarcane variety SP80-3280, towards a better understanding of somatic embryogenesis in this species. To that end, embryogenic cultures (CE) and non-embryogenic cultures (CNE) were established, subcultured and monitored. Their cell and developmental profiles of carbohydrates, starch, polyamines and total protein were analyzed. Using growth curves of CE and CNE, we observed that both cultures reached maximum growth on the 24th day of cultivation, at which time fresh weight (FW) started to decrease. The largest increase in FW was found in CE. With the quantification of fructose, glucose and sucrose, it was demonstrated that the predominant carbohydrate is sucrose in CE and in CNE is glucose. Additionally, it was also observed that contents of fructose and glucose in CE vary simultaneously, demonstrating the relationship between their metabolisms. Quantification of starch revealed the highest concentration in CNE, which demonstrates that CE uses energy derived from starch degradation to enable its cells to develop somatic embryogenesis. However, the quantification of total protein content was significantly higher in CE, as storage proteins for development of the embryo are probably being accumulated. Finally, free polyamines contents were higher in CNE, the predominant PA in CE being spermidine and in CNE putrescine, which relates to the type of development of cells of each culture. Furthermore, we demonstrated a lower PAs ratio [Ratio PA = Put / (Spd + Spm)] in CE, which also relates to its ability to develop somatic embryogenesis.

**Keywords:** Sugarcane. Carbohydrates. Starch. Proteins. Polyamines.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O Sistema Cana-de-Açúcar

Cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é planta alógama, gramínea perene pertencente à família Poaceae. É uma das mais antigas e mais importantes culturas do mundo (Vettore et al., 2003; Chengalrayan et al., 2005; Lakshmanan et al., 2005), tendo sua provável origem nas ilhas do Arquipélago da Polinésia (Cesnik, Miocque, 2004), onde foi domesticada e então disseminada por todo sudeste Asiático (Marques et al., 2009).

A cultura da cana-de-açúcar é responsável por grande produção de álcool e por 70% do açúcar mundial (Chengalrayan et al., 2005; Lakshmanan et al., 2005), além de ser fonte cada vez mais importante para a produção de biocombustíveis (McCormick et al., 2009).

O gênero *Saccharum* é formado por pelo menos cinco espécies: *Saccharum officinarum*, *Saccharum sinensis*, *Saccharum barberi*, *Saccharum spontanium*, *Saccharum robusyum* e as variedades de cana-de-açúcar cultivadas em escala comercial representam um híbrido multi-específico, que recebe a denominação *Saccharum spp* (Veiga et al., 2006). Como consequência dos cruzamentos interespecíficos, as cultivares produzidas possuem alto grau de poliploidia, possuindo número de cromossomos variando entre 100 e 130, sendo a maioria destes provenientes da espécie *S. officinarum* (Vettore et al., 2003).

A cultura da cana-de-açúcar é amplamente cultivada ao longo dos trópicos e subtropicais e suas principais indústrias são encontradas no Brasil, China e Índia, sendo produzida comercialmente em muitos outros países (Snyman et al., 2011).

No Brasil, as primeiras mudas de cana-de-açúcar foram introduzidas em 1502, vindas da Ilha da Madeira, trazidas por Martim Afonso de Souza (Cesnik, Miocque, 2004), sendo o primeiro engenho de açúcar construído em 1532, na capitania de São Vicente. No século XVII o Brasil já era o maior produtor e fornecedor mundial de açúcar (Marques et al., 2009). Porém, em 1929 a economia açucareira no Brasil sofreu uma crise, devido à queda dos preços internacionais e ao aumento da utilização do açúcar de beterraba produzido na Europa (Veiga et al., 2006).

Para atenuar esta crise, em 1931, o governo brasileiro tornou obrigatória a mistura de 5% de álcool etílico à gasolina utilizada no país (Veiga et al., 2006). Então, em 1933 foi criado o Instituto do Açúcar e do Alcool- IAA que na década de 70 cria incentivos políticos para aumentar a produção e produtividade de cana-de-açúcar no Brasil (Santiago et al., 2006). Em 1975, buscando a diminuição da utilização de combustíveis fósseis e devido à pressão realizada pelo setor produtivo de cana-de-açúcar, o Governo Federal cria o Programa Nacional do Alcool – PROÁLCOOL (Santiago et al., 2006), gerando subsídio para implantação de destilarias de álcool no país e para o desenvolvimento das plantações de cana-de-açúcar.

Em 1979, a indústria automobilística brasileira lançou no mercado seus primeiros modelos de carros movidos a álcool (Veiga et al., 2006). As vendas desses modelos chegaram a representar 95% das vendas totais, em 1985 (Santiago et al., 2006). Mas, a partir de 1990 o setor sucroalcooleiro nacional volta a sofrer interferências políticas importantes, como a desregulamentação do setor e a extinção do IAA, tendo como consequência a liberação dos preços da cana-de-açúcar, do açúcar e do álcool. Além disso, a política econômica, com objetivo de controlar a inflação através de diversos planos econômicos, inclusive com congelamento de preços, também contribuiu para aumentar a crise no setor canavieiro (Santiago et al., 2006). A partir de 1986, houve ainda uma redução no percentual de participação dos veículos movidos a álcool no total de vendas, até atingir os mais baixos índices em 1997/98 (Veiga et al., 2006).

Contudo, em 2003, o sucesso do lançamento dos veículos flex fuel, cujas vendas em 2004 já representavam 20,2% do total de vendas internas no país, novamente impulsionaram o consumo de álcool, aquecendo a produção de cana-de-açúcar (Veiga et al., 2006). Nota-se também que os recentes aumentos nos preços internacionais do petróleo têm influenciado positivamente a demanda mundial de álcool carburante (Veiga et al., 2006).

Hoje, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar refinado e álcool combustível obtidos a partir de cana-de-açúcar. De acordo com o terceiro levantamento da safra 2011/2012 feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produção nacional está em torno de 572 milhões de toneladas. O Estado

de São Paulo é o maior produtor do país, com 52,2% da área nacional plantada (Conab, 2012).

Devido à sua importância na indústria agrícola global, um grande aporte de esforços e recursos tem sido direcionado para pesquisas voltadas ao setor sucroalcooleiro no País. Parte das pesquisas tem incidido sobre o melhoramento de cultivares de cana-de-açúcar por meio de reprodução vegetal e, mais recentemente, por meio da biotecnologia (Chengalrayan et al., 2005).

O alto nível de ploidia, requisitos específicos de clima para o florescimento e a definição de sementes, em conjunto com longo ciclo de vida, são as maiores limitações para a melhoria através de técnicas convencionais de melhoramento. Além disso, uma vez que muitas variedades de cana-de-açúcar não produzem sementes férteis, e devido a dificuldades de autofecundação e autocruzamento, a cultura é uma das espécies de plantas que não poderia ser produzida comercialmente sem intervenção humana (Asad et al., 2009).

Nesse contexto, a biotecnologia vegetal tem o potencial de superar problemas e possibilitar o melhoramento da cana-de-açúcar, por meio de técnicas de cultura de tecidos a nível celular e de engenharia genética a nível molecular, trazendo novas oportunidades para a produção de cultivares geneticamente superiores, com alta qualidade de plantio, tendo as características desejadas (Chengalrayan et al., 2005; Asad et al., 2009).

Técnicas *in vitro* para a propagação em massa de mudas viáveis de cana-de-açúcar via organogênese e/ou embriogênese somática (direta e indireta) são alvo de diversos projetos que visam o estudo e a compreensão da morfogênese *in vitro* nesta espécie (Lakshmanan et al., 2005; Snyman et al., 2011).

## **1.2 Embriogênese Somática**

Em 2005, o periódico Science publicou uma edição comemorativa aos seus 125 anos, que versa sobre as grandes perguntas científicas que a humanidade ainda não conseguiu responder. Inicialmente 125 questões foram selecionadas e dentre estas as 25 perguntas mais importantes foram discutidas e publicadas na

edição comemorativa. Uma destas questões foi: “Como uma única célula somática vegetal consegue se transformar numa planta completa?” (Kennedy, Norman, 2005). Essa indagação figura entre as questões de maior relevância científica que ainda se encontram sem resposta na atualidade (Vogel, 2005).

Em resumo, esta questão se remete ao conceito da totipotência em plantas, inerente às células vegetais, sendo a morfogênese *in vitro* o principal exemplo deste conceito. Na morfogênese *in vitro*, a embriogênese somática (ES) é um processo onde, células somáticas (já diferenciadas) isoladas ou em pequeno grupo dão origem a embriões (Tautorus et al., 1991), numa seqüência morfogenética que se aproxima aos eventos representativos da embriogênese zigótica (que é derivada da fusão de células gaméticas) (Floh et al., 2007).

Desde o princípio da cultura de tecidos vegetais, experimentos com a utilização dos mais variados tipos de explantes e distintas alterações nos meios de cultura para utilização *in vitro* têm sido testados na tentativa de desvendar os complexos processos moleculares, fisiológicos e bioquímicos que determinam a competência morfogenética em células vegetais. Passados cerca de meio século, esses processos metabólicos ainda não foram totalmente esclarecidos (Mordhorst et al., 1997).

Neste sentido, nossa hipótese de trabalho é que a compreensão dos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares associados ao crescimento celular e desenvolvimento *in vitro* apresentam elevado potencial de aplicação no desenvolvimento e otimização de protocolos para embriogênese somática de cana-de-açúcar.

A embriogênese *in vitro* foi descrita pela primeira vez em 1958, por Steward e sua equipe e Reinert e sua equipe, independentemente, em *Daucus carota* (Floh et al., 2007). A cultura de tecidos de cana-de-açúcar foi iniciada no Havaí, em 1961 (Chengalrayan et al., 2005; Asad et al., 2009), e a embriogênese somática direta foi o caminho adotado pelos primeiros relatos sobre micropropagação dessa espécie (Snyman et al., 2011). Posteriormente, vários protocolos para embriogênese somática e organogênese, que regeneram plantas completas direta ou indiretamente, foram desenvolvidos usando calos derivados de explantes diversos como inflorescências imaturas, folhas jovens e meristemas apicais (Chengalrayan et al., 2005; Asad et al., 2009).

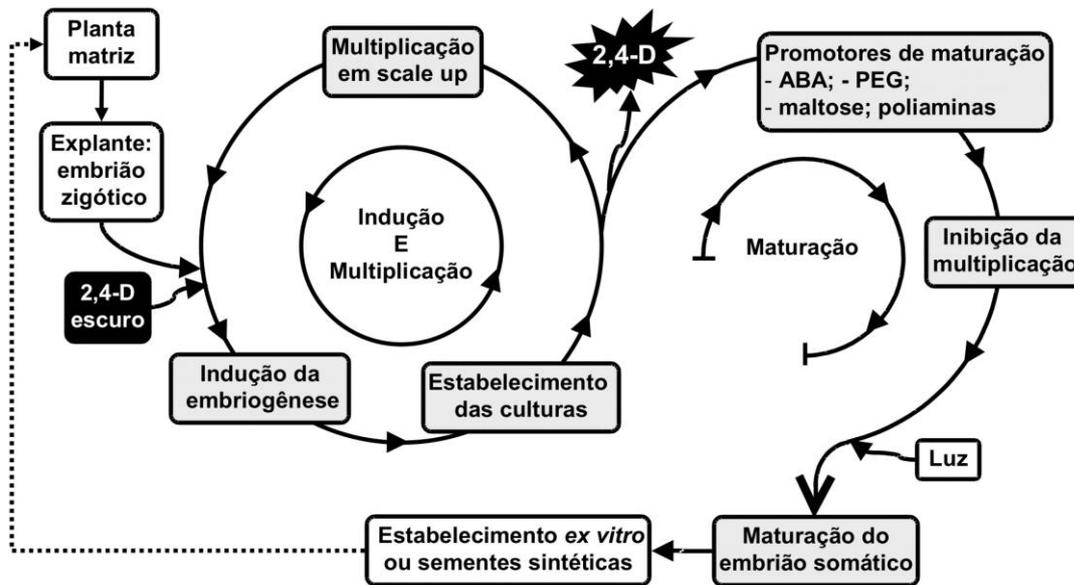
Dois padrões básicos de expressão de embriogênese somática ocorrem *in vitro*. Um deles corresponde ao modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos-matrizes, sem a formação de estágios intermediários de calo (Guerra et al., 1999). O outro corresponde ao modelo indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que representa células em diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, podendo adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (Guerra et al., 1999). Estes processos envolvem mecanismos complexos de reativação celular, divisão, reprogramação do metabolismo e desenvolvimento (Fehér et al., 2003; Floh et al., 2007).

A modulação da embriogênese somática pode ser obtida em um sistema biotecnológico de dois ciclos básicos. O primeiro ciclo é o de indução e multiplicação, que se inicia com a indução de CE em meios de culturas contendo auxinas, principalmente o 2,4-D, e compreende a fase de multiplicação, em meios contendo auxinas em baixas concentrações. O segundo ciclo é o de maturação, que ocorre com a retirada da auxina do meio e é caracterizado pelo uso de promotores de maturação. Como produtos desse segundo ciclo são obtidos embriões somáticos maduros, passíveis de germinação *in vitro* e *ex vitro* ou que podem ser utilizados para produção de sementes sintéticas (Steiner et al., 2008) (Figura 1).

As condições para promover a embriogênese somática estão relacionadas com a presença de reguladores de crescimento, estresses osmóticos, alterações de pH, choques térmicos e tratamentos com diferentes substâncias, sendo as auxinas referenciadas como essenciais na indução do processo (Floh et al., 2007). Auxinas são uma das mais importantes classes de fitormônios, uma vez que são os reguladores chave de vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas (Pieruzzi et al., 2011).

Atualmente, a embriogênese somática é induzida em explantes de cana-de-açúcar utilizando, principalmente, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético, uma auxina sintética. Esses embriões se desenvolvem a partir de uma única célula, pequena, de paredes finas e rica em citoplasma, que contém muitos vacúolos e grânulos de amido (Chengalrayan et al., 2005; Asad et al., 2009; Snyman et al., 2011).

Figura 1 - Modulação da embriogênese somática em espécies arbóreas.



(1) ciclos de indução e multiplicação e (2) ciclo de maturação.

FONTE: adaptada de Steiner et al., 2008.

Além das condições de cultivo, também devem ser considerados como fundamentais, o explante inicial, incluindo o seu genótipo, o estágio de desenvolvimento e as condições fisiológicas, como por exemplo, o conteúdo hormonal endógeno do material. Portanto, a embriogênese pode ser definida como um processo multifatorial e altamente complexo (Floh et al., 2007).

Comparada 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, possibilitando baixar os 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; e 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; Lipavská, Konrádová, 2004). Entretanto, a principal limitação dos sistemas de embriogênese somática, desenvolvidos para várias espécies, é a variação somaclonal ocorrida após sucessivas subculturas, afetando o desenvolvimento das plantas produzidas (Lakshmanan et al., 2005).

Conforme a literatura, a capacidade das técnicas de cultivo *in vitro* de produzir um grande número de plantas rapidamente, tem sido explorada para aplicação comercial em indústrias de açúcar em todo o mundo (Snyman et al., 2011). Além disso, foi observado que a aclimação de plantas de cana-de-açúcar produzidas *in vitro* geralmente é bem sucedida. Mais de 85% das plantas derivadas de embriões somáticos sobreviveram às condições de transferência para estufa. Após a aclimação ao ambiente de estufa, essas plantas foram transferidas para condições de campo onde a sobrevivência foi superior a 90% (Snyman et al., 2011).

Para produção de plantas transgênicas através de qualquer método de transformação (físico, químico ou biológico) é necessário sistemas de regeneração de plantas altamente eficientes e confiáveis (Asad et al., 2009). O método com potencial de maior taxa de multiplicação é a regeneração por meio de embriogênese somática (Hoenemann et al., 2010). Os calos embriogênicos têm sido frequentemente usados em experimentos de transferência de genes com monocotiledôneas, pois podem ser manipulados para produzir plantas transformadas férteis (Grando et al., 2002).

Além de apoiar programas de engenharia genética, protocolos bem estabelecidos para manipulações da embriogênese somática *in vitro* oferecem um modelo bastante interessante para estudos básicos de fisiologia, biologia celular, bioquímica, genética da diferenciação e morfogênese em vegetais (Floh et al., 2007; Nieves et al., 2008). Além disso, a embriogênese somática constitui estratégia única para lidar com as limitações de diversidade genética estreita, como a propagação e o armazenamento (Silveira et al., 2002; Snyman et al., 2011).

Durante os últimos anos, muitos estudos têm sido publicados analisando a embriogênese somática relacionada a um perfil de expressão gênica. No entanto, estudos que visam uma melhoria dos protocolos para a propagação em massa são realizados insuficientemente (Hoenemann et al., 2010). Embora existam relatos de protocolos para inúmeras espécies, os seus avanços ainda são limitados pela falta da compreensão dos estímulos e condições necessárias para sua indução e controle da embriogênese somática (Lipavská, Konrádová, 2004; Floh et al., 2007).

### 1.3 Multiplicação Celular

O desenvolvimento do embrião somático, assim como do embrião zigótico, ocorre em uma ordem sequencial, onde estágios podem ser diferenciados: a divisão celular, a diferenciação e a maturação (Nieves et al., 2008). Dentre as etapas da embriogênese, a indução e multiplicação (divisão celular) de CE é uma das etapas mais importantes do protocolo (Guerra et al., 1999).

A habilidade para indução de calos embriogênicos é influenciada pelo genótipo, assim como sua resposta morfogênética e a habilidade de regenerar plantas, indicando que estes critérios são genótipo-dependentes (Lima et al., 2001; Cidade et al., 2006; Lakshmanan, 2006). De acordo com Gandonou et al. (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.

As auxinas são as substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação (modelos indiretos) e rediferenciação (modelos diretos) durante a indução, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (Guerra et al., 1999).

Em nível celular, auxinas controlam a divisão, alongação e diferenciação, bem como a polaridade de células vegetais (Pieruzzi et al., 2011). Atuam de duas maneiras durante o crescimento celular: estimulando a acidificação da parede celular que resulta em elevada extensibilidade e induzindo a transcrição de mRNAs que codificam proteínas associadas com o crescimento celular (Richard et al., 2002).

O 2,4-D, principal auxina utilizada na embriogênese somática em cana-de-açúcar, quando acima de uma determinada concentração, pode assumir um duplo efeito nas culturas, atuando como auxina e como um agente de estresse (Floh et al., 2007). Então, tecidos de folhas jovens de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* na presença de 2,4-D originam dois tipos de calos na embriogênese indireta: os calos embriogênicos, caracterizados por apresentarem aspecto nodular opaco, e facilmente destacável, e os calos não-embriogênicos que são translúcidos e mucilaginosos (Lakshmanan, 2006).

O início e a manutenção de CE foram monitorados em um grande número de plantas, incluindo muitos membros da família Poaceae (gramíneas). Calos embriogênicos apresentam maior velocidade no desenvolvimento e formam plantas por embriogênese somáticas, enquanto os calos não-embriogênicos crescem lentamente, de forma desordenada, e formam brotos ou raízes por organogênese (Nieves et al., 2003).

O crescimento dinâmico em CE, na maioria dos casos é descrito por uma curva sigmóide mostrando a fase Lag, seguida pelas fases exponencial, linear e estacionária (Silveira et al., 2004a). A fase Lag é considerada um período de adaptação das células ao novo meio de cultura. Nas fases exponencial e linear, a alta razão de divisão celular resulta no crescimento das culturas. Na fase estacionária a divisão celular é gradativamente reduzida (Silveira et al., 2004a).

O crescimento de CE é geralmente associado com algumas mudanças bioquímicas, como a síntese e mobilização de proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos. O nível dessas substâncias depende das diferentes fases de crescimento e de suas funções no suprimento energético para o crescimento celular (Silveira et al., 2004a).

#### **1.4 Aspectos Bioquímicos da Embriogênese Somática**

Calos embriogênicos e não-embriogênicos podem ser visualmente diferenciados por sua morfologia, mas pouco se sabe sobre os eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem quando as células somáticas se tornam competentes para produzir embriões somáticos (Nieves et al., 2003).

Assim, informações valiosas podem ser obtidas através do monitoramento de variáveis bioquímicas, uma vez que estas têm sido demonstradas como potenciais discriminadores entre tecidos embriogênicos e não-embriogênicos (Nieves et al., 2008). Nieves et al. (2003) observaram que CE de cana-de-açúcar apresentam maior atividade metabólica que as CNE.

A síntese e o acúmulo de substâncias de reserva representam um estágio importante na embriogênese zigótica, pois permitem o armazenamento de compostos que serão utilizados pelo embrião até o estabelecimento da autotrofia por

parte da plântula recém-formada. Estes compostos podem ser considerados marcadores confiáveis da qualidade dos embriões zigóticos e somáticos (Merkle et al., 1995).

Um melhor conhecimento dos aspectos bioquímicos das culturas podem ainda ter aplicações úteis na caracterização das diferentes etapas da embriogênese somática. Assim, calos regeneráveis e não regeneráveis fornecem um sistema experimental útil para estudar o mecanismo de morfogênese *in vitro* (Nieves et al., 2003).

Além disso, uma melhor compreensão de eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem durante a embriogênese somática é essencial para aumentar a eficiência do desenvolvimento de embriões (Silveira et al., 2004a, 2006) e gerar prováveis marcadores bioquímicos para a competência embriogênica e qualidade dos embriões formados (Klimaszewska et al., 2004). Dentre os compostos endógenos com importância para o desenvolvimento da embriogênese somática, destacam-se os carboidratos e amido, proteínas e poliaminas, que atuam em diferentes fases do processo morfogênético.

#### 1.4.1 Carboidratos e Amido

Os carboidratos são fotossintetizados em plantas, inicialmente, como monossacarídeos, que são então transformados em dissacarídeos, trissacarídeos e açúcares alcoóis (Gómez-González et al., 2010). Na maioria das plantas a sacarose é a forma principal de transporte de carboidratos e o amido é o principal carboidrato de reserva (Geigenberger et al., 2004).

A função primária dos açúcares é servir de fonte de energia para alterações metabólicas ou participar como precursores moleculares na biossíntese de lipídios, proteínas, antioxidantes e polissacarídeos, fornecendo moléculas de carbono (Pescador et al., 2008; Gómez-González et al., 2010).

Os carboidratos, além de atuar como substratos para o crescimento, podem também regular a morfogênese e a diferenciação celular nos vegetais, desempenhando papel chave na estrutura da parede celular (Smeekens, 2000).

Evidências indicam ainda que o suprimento de açúcares pode regular a expressão de genes envolvidos em processos como a floração, fotossíntese, glicólise, metabolismo do nitrogênio e regulação do ciclo celular (Smeekens, 2000), podendo, esta regulação, ocorrer nos níveis de transcrição, tradução e pós-tradução (Delrot, 2000; Rapaka et al., 2008).

Além disso, durante todas as fases de desenvolvimento do embrião, os polissacarídeos parecem desempenhar um papel importante (Lipavská, Konrádová, 2004). Em alguns casos, os níveis de açúcar ou seu fluxo parecem determinar a ocorrência de um determinado evento ou o momento em que ele ocorre, como em processos de germinação das sementes (Gibson, 2005). Adicionalmente, o acúmulo de reservas adequadas é vital para a embriogênese somática de plantas, assim como para a conversão em plântulas, após a obtenção de embriões cotiledonares (Flinn et al., 1993).

Estoque de carboidratos como amido e sacarose, que desempenham importantes papéis no metabolismo celular, também contribuem para a reserva total de carboidratos nas plantas (Opsahl, Benner, 1999).

Diferentes autores têm relatado a presença de amido nas células vegetais no início do processo de desenvolvimento *in vitro*. O possível papel desse polissacarídeo nestes processos ainda não está claro, embora tenha sido sugerido que poderia atuar como uma fonte de energia ou como um agente osmótico essencial para o desenvolvimento. No entanto, a metabolização destes grãos de amido foi reportada quando foram iniciados os processos de organogênese e embriogênese somática (Martin et al., 2000).

Na maioria das plantas, durante o processo de formação da semente e/ou do embrião, a glicose e a frutose também estão presentes na fase inicial de desenvolvimento embrionário, e diminuem gradualmente, desaparecendo na maturidade. Contrariamente, a sacarose é estocada na fase final do desenvolvimento embrionário (Focks, Benning, 1998). Estes resultados sugerem que cada carboidrato possui importância em determinada fase de desenvolvimento do embrião. Neste sentido, a variação dos carboidratos solúveis e do amido na embriogênese somática pode fornecer informações importantes sobre a conversão de embriões somáticos em plântulas (Pescador et al., 2008). Estudos em *Acca sellowiana* demonstraram alta quantidade de sacarose, frutose e outros carboidratos

em diferentes estágios do desenvolvimento de embriões somáticos (Pescador et al., 2008).

Em sistemas de cultura *in vitro* faz-se necessário o fornecimento externo de carbono, uma vez que as CE são mantidas no escuro, sendo basicamente heterotróficas. Neste contexto, os processos de síntese e armazenamento de compostos relacionados com a embriogênese ocorrem de forma diferenciada nos sistemas de embriogênese somática e zigótica, pois embriogênese zigótica possuem uma relação fonte-dreno com a planta matriz até a maturação fisiológica do embrião (Sghaier-Hammami et al., 2009).

Para a obtenção de embriões somáticos em cana-de-açúcar, bem como em outras espécies, o fornecimento externo de carbono ocorre normalmente por meio da adição de sacarose ao meio de cultivo inicial, ao qual o explante será exposto (Mordocco et al., 2009). Parte da sacarose contida no meio de cultura sofre degradação extracelular, sendo convertida e disponibilizada para as células (Martin et al., 2007). As moléculas de sacaroses interiorizadas representam uma importante fonte de armazenamento, e após sua hidrólise pela ação de invertases, apresentam-se, em grande parte dos sistemas biológicos, como a principal fonte de carbono para a síntese de carboidratos metabolicamente ativos, polissacarídeos estruturais e de armazenamento (Martin et al., 2007).

A alocação dos carboidratos para o interior das células vegetais em culturas de calos com potencial embriogênico tem recebido especial atenção, uma vez que os tecidos que normalmente efetuam esse transporte em plantas, como o floema e as células parenquimáticas, ainda não se encontram diferenciados nos calos (Gutiérrez-Miceli et al., 2005).

O conhecimento bioquímico, em especial dos conteúdos de carboidratos solúveis, em embriões somáticos comparados ao seu análogo zigótico, pode oferecer informações que ajudariam a prever a fidelidade de embriões somáticos na regeneração de plantas, especialmente na etapa de conversão (Chanprame et al., 1998).

O uso de culturas de calos pode ser preferível no estudo do metabolismo de acúmulo de sacarose, por representar uma grande possibilidade de controle e manipulação do meio de cultivo, facilitando o controle das condições ambientais e

viabilizar o uso de diferentes cultivares simultaneamente (Gutiérrez-Miceli et al., 2005).

A utilização do cultivo *in vitro* de calos de cana-de-açúcar apresenta-se, dessa forma, como um modelo experimental apropriado para a caracterização qualitativa e quantitativa do metabolismo de carboidratos em calos embriogênicos e não-embriogênicos, e para identificação de possíveis marcadores bioquímicos da embriogênese, conforme estudado em muitas espécies (Martin et al., 2007).

Para entender o papel dos carboidratos durante a embriogênese somática, e nas diferentes fases desta, é importante obter informações sobre seus níveis endógenos e seu metabolismo para propor tratamentos que melhorem ou favoreçam o desenvolvimento do embrião. Entretanto, até o momento, apenas um número pequeno de relatos está disponível associando embriogênese somática e metabolismo endógeno de carboidratos (Lipavská, Konrádová, 2004).

#### 1.4.2 Proteínas

Proteínas são macromoléculas constituídas a partir de 20 aminoácidos canônicos, juntamente com selenocisteína e pirrolisina que muitas vezes são referidas como 21° e 22° aminoácidos (Rodgers, Shiozawa, 2008).

As proteínas desempenham um papel importante no metabolismo (Nieves et al., 2008). Entre as funções e influências de moléculas regulatórias, o papel das proteínas nos processos de diferenciação celular é de particular interesse (Saare-Surminski et al., 2000). O ciclo celular é realizado pela síntese de várias proteínas novas que atuam em mudanças morfológicas e bioquímicas nas células durante a atividade mitótica (Silveira et al., 2004a).

Dessa forma, existem vários estudos relacionados à síntese e ao acúmulo de proteínas de armazenamento em diferentes estágios durante a embriogênese somática, além de estudos relacionados à mudanças em seu perfil ou em sua função como receptores (Santa-Catarina et al., 2006; Nieves et al., 2008). Em geral, o aumento do acúmulo de proteínas é observado durante o desenvolvimento do embrião, conforme observado na embriogênese zigótica em *Ocotea catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2006).

Esse aumento protéico é resultado, principalmente, da síntese de proteínas LEA (“late embryogenesis abundant”) e de proteínas de reserva (Bewley, Black, 1994). As proteínas LEA são classificadas em cinco grupos em virtude da similaridade de suas seqüências de aminoácidos. Elas apresentam baixa complexidade e uma grande afinidade com as moléculas de água, atuando na proteção à desidratação da semente (Boudet et al., 2006), representando portanto um papel fundamental na manutenção da viabilidade dos embriões.

As proteínas LEA também se acumulam em altos níveis no desenvolvimento de sementes, durante a maturação e na desidratação de tecidos vegetativos de plantas em restabelecimento e são extremamente diversificadas em termos de variabilidade genotípica, regulação e localização em nível celular e tecidual (Bewley, Black, 1994; Boudet et al., 2006).

A capacidade embriogênica dos calos e suspensões celulares de formar embriões somáticos indica que existe uma diferença no controle da expressão genética de proteínas entre células embriogênicas e não-embriogênicas (Oropeza et al., 2001). Assim, um marcador bioquímico poderia ser útil, a fim de identificar esta expressão gênica diferencial antes de qualquer alteração morfológica ser aparente (Oropeza et al., 2001).

Perfis de proteínas têm sido utilizados como marcadores moleculares com sucesso em culturas de várias espécies. Embora sejam menos polimórficos que os marcadores de DNA, informações diretas podem ser adquiridas sobre a variabilidade genética para características alvo (Rodríguez et al., 2011).

Neste contexto, o estudo do metabolismo e do armazenamento de proteínas pode ser utilizado para avaliar a qualidade de células e embriões somáticos (Lelu-Walter et al., 2008). Padrões protéicos vêm sendo utilizados como marcadores da competência das CE, ocorrendo várias diferenças nos perfis protéicos entre CE e CNE (Kormuták, Vookova, 1997). Neste sentido, o uso de proteínas como marcadores para monitorar e compreender as diferentes respostas biológicas apresenta-se como uma alternativa para o desenvolvimento de biotecnologias aplicadas a cultura da cana-de-açúcar.

### 1.4.3 Poliaminas (PAs)

As PAs são aminas policatiônicas alifáticas de baixo peso molecular (Santa-Catarina et al., 2006; Nieves et al., 2008), 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 (Steiner et al., 2007; Pieruzzi et al., 2011).

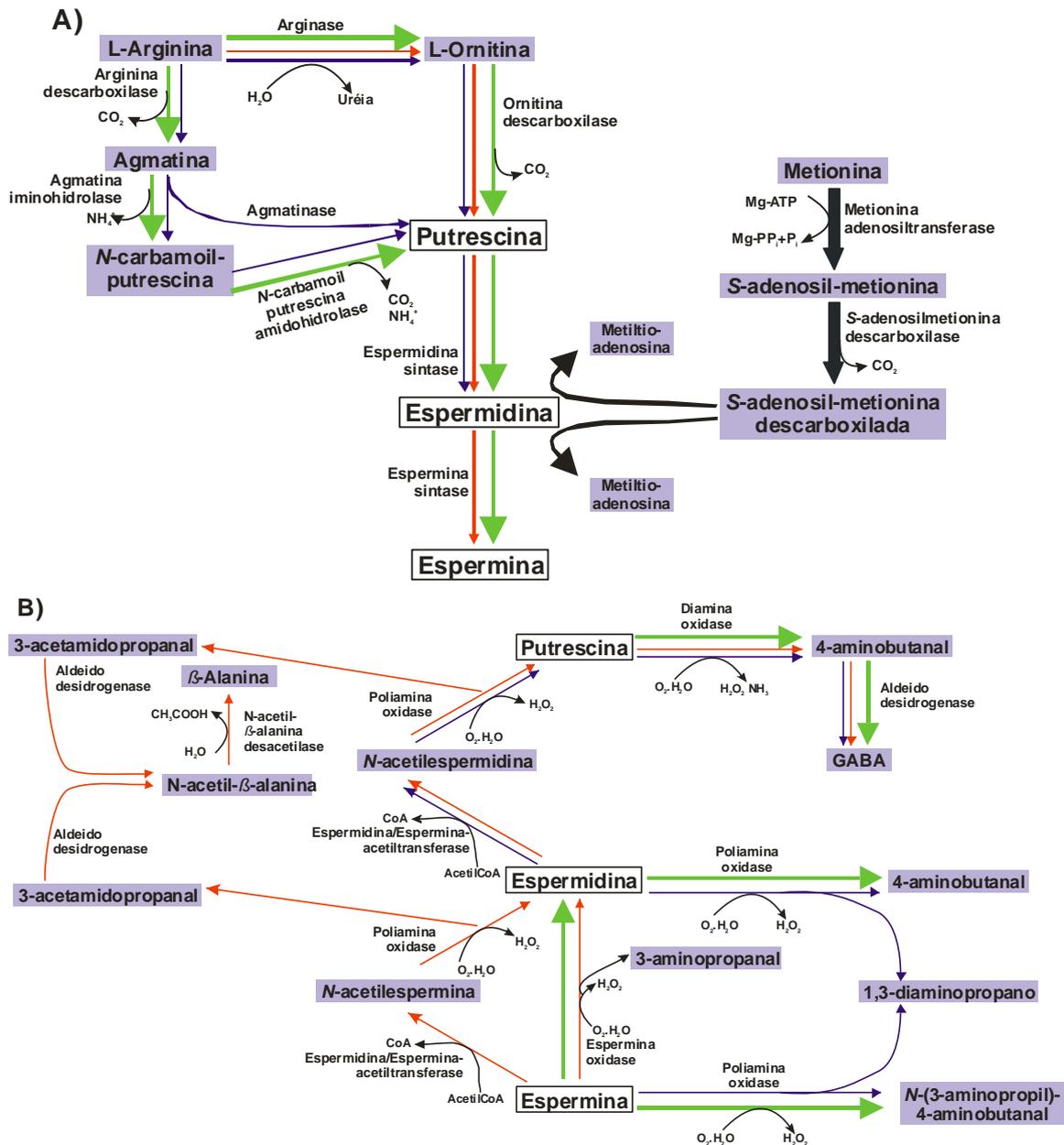
Elas estão presentes em diversos organismos tais como bactérias, fungos, animais e vegetais superiores (Wallace et al., 2003). Nos vegetais as principais PAs presentes são putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) (Silveira et al., 2004a, 2006; Pieruzzi et al., 2011), estando em todos os compartimentos celulares, indicando sua participação em diversos processos fundamentais na célula. (Santa-Catarina et al., 2006; Silveira et al., 2006; Steiner et al., 2007; Nieves et al., 2008).

O metabolismo de PAs envolve: (1) a biossíntese de Put a partir de arginina e ornitina pelas enzimas arginina descarboxilase e ornitina descarboxilase, respectivamente; (2) a conversão de Put em Spd e, subsequentemente, em Spm por adições sucessivas de grupos aminopropil a partir da S-adenosil-metionina (SAM), que é produto da reação da SAM descarboxilase (SAMDC); e (3) o catabolismo de Put, Spd e Spm por diamina e PA oxidases (Figura 2) (Minocha et al., 2004; Kusano et al., 2008).

Pode-se citar um amplo espectro de atividades biológicas em que as PAs participam, tais como a regulação da expressão gênica, a modulação de sinal, a proliferação celular e a estabilização de membrana (Silveira et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2007; Pieruzzi et al., 2011).

Esses papéis têm sido associados com o controle da divisão celular, a embriogênese, a formação de raízes, o desenvolvimento floral, o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, o metabolismo secundário, a senescência e as respostas a estresses bióticos e abióticos. Mais recentemente, PAs foram encontrados também regulando a morte celular programada e a apoptose (Bais, Ravishankar, 2002).

Figura 2 - Via metabólica de poliaminas em plantas.



A) biossíntese e B) degradação. Setas verdes correspondem às vias presentes em plantas. Setas azuis e vermelhas representam vias presentes em bactérias e animais, respectivamente.

FONTE: Adaptado de Kusano et al. (2008).

Alguns autores propuseram que PAs e os compostos a elas relacionados podem ser considerados como tipos de reguladores de crescimento hormonal ou mensageiros secundários em muitos processos, incluindo a organogênese e a embriogênese, apesar de serem encontrados nas células vegetais em níveis significativamente superiores aos dos hormônios vegetais (Bais, Ravishankar, 2002).

Diferenças significativas foram observadas na exigência de PAs entre os diferentes genótipos, indicando que os perfis destes compostos podem ser dependentes do genótipo (Silveira et al., 2004b). Além de estudos que avaliaram o efeito de uma única PA, outros estudos associam eventos fisiológicos nas plantas com a relação entre duas ou mais PAs (Pieruzzi et al., 2011).

Durante os processos de embriogênese somática e zigóticos, PAs têm sido usadas como biomarcadores do desenvolvimento (Minocha et al., 1999). Tem sido proposto que a relação Put: Spd é um importante biomarcador da capacidade de regeneração em plantas (Pieruzzi et al., 2011). Estão disponíveis dados limitados descrevendo as variações nos níveis de PAs e seus modos de ação nos vários processos morfogênicos (Silveira et al., 2004b; Santa-Catarina et al., 2006; Nieves et al., 2008).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos em nosso trabalho foi possível analisar e comparar CE e CNE em seu crescimento celular, quantificando carboidratos solúveis (frutose, glicose e sacarose), amido, proteínas totais e PAs, determinando assim as alterações endógenas desses parâmetros durante o processo de multiplicação celular.

Com o acompanhamento do crescimento celular determinamos as curvas de crescimento de CE e CNE, efetuadas a partir de suas MF, demonstrando que as CE possuem maior crescimento celular comparativamente às CNE, o que parece se relacionar a uma maior atividade metabólica de CE. Além disso, se confirma que a escassez de nutrientes no meio de cultura influencia diretamente no crescimento celular *in vitro*. Foi observado ainda que as curvas de crescimento das culturas apontam semelhanças com o modelo de curva sigmóide apresentado por George (2008).

Com a quantificação de carboidratos durante a multiplicação celular, um menor conteúdo das hexoses analisadas foi encontrado em CE, o que parece se relacionar com uma reprogramação do metabolismo celular (Blanc et al., 2002). Em CE, a sacarose foi o carboidrato predominante, e a predominância deste carboidrato se relaciona ao alongamento celular e ao armazenamento de proteínas de reserva, para determinar a existência de potencial para desenvolver embriões somáticos. Além disso, foi possível determinar que em CE os metabolismos de glicose e frutose variam simultaneamente, mostrando estar diretamente ligados e serem utilizados nos mesmos momentos.

Porém o presente estudo não pôde explicitar se o carboidrato presente no meio de cultivo tem relações com os carboidratos intracelulares. Estudos posteriores, variando o tipo de carboidrato no meio e a quantidade destes carboidratos, com simultânea quantificação de carboidratos externos e internos durante todo desenvolvimento, se mostram de fundamental interesse para determinar se a presença de carboidratos no meio de cultivo realmente tem correlação com os carboidratos intracelulares.

Com a análise de amido, verificou-se um maior conteúdo em CNE, o que também pode estar relacionado ao maior metabolismo das CE, que podem estar utilizando os carboidratos produzidos para desenvolvimento do ciclo celular, não formando reservas, o que confirma que o amido é rapidamente metabolizado em tecidos embrionários, fornecendo energia para as intensas atividades mitóticas.

Outra perspectiva de análise futura seria o estudo e quantificação das enzimas-chave relacionadas ao metabolismo de carboidratos, como realizado por Iraqi, Tremblay (2001) para o gênero *Picea*, para determinar se as diferenças no conteúdo de carboidratos e amido ocorrem por aumento de produção ou diminuição de consumo destas variáveis bioquímicas.

Com a quantificação protéica observamos que o conteúdo de proteínas totais é significativamente superior em CE, o que foi relacionado com a produção de proteínas específicas para o desenvolvimento do embrião. O aumento no conteúdo protéico foi relacionado, por diversos autores, a aquisição de competência para desenvolver embriões somáticos. Estudos futuros seriam necessários para determinar o padrão de proteínas encontrado na multiplicação de CE e CNE, o que pode ser realizado através de análises da expressão diferencial de proteínas utilizando ferramentas proteômicas.

Com a determinação de PAs, foi observado que Spd é a PA predominante em CE, enquanto em CNE predomina a Put. Diversos autores relacionam maior teor de Spd com a capacidade de maturar embriões somáticos e com a evolução morfológica das CE. Já o maior conteúdo de Put está relacionado com a divisão celular e multiplicação, sem ocorrer a diferenciação. Esses dados estão coerentes com os encontrados para carboidratos e reforçam a capacidade de CE desenvolver embriões somáticos.

Também observamos uma razão entre PAs reduzida, bem como baixos níveis de PA totais, nas CE, o que tem sido relatado na literatura como determinante do adequado desenvolvimento embrionário. Para confirmar o papel das PAs durante o crescimento celular de CE e CNE e durante a maturação, diferentes PAs poderiam ser adicionadas ao meio de cultura, sendo seus conteúdos internos e externos determinados durante todo o desenvolvimento. Ainda, visando compreender os processos metabólicos de PAs durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar, análises dos níveis de aminoácidos, principalmente daqueles envolvidos no

metabolismo de PAs, como arginina, ornitina, metionina e citrulina, seriam de grande importância.

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho mostram que as CE e CNE de cana-de-açúcar possuem características bioquímicas diferentes, que possivelmente estão relacionadas com a modulação da sua competência embriogênica.

## REFERÊNCIAS

- Asad S, Arshad M, Mansoor S, Zafar Y. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). African Journal of Biotechnology; 2009;8;1214-1218.
- Bais HP, Ravishankar GA. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. Plant Cell, Tissue and Organ Culture; 2002;69:1–34.
- Bewley JD, Black M. Seeds: physiology of development and germination. New York: Plenum Press; 1994;2;445.
- Blanc G, Lardet L, Martin A, Jacob JL, Carron MP. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). Journal of Experimental Botany; 2002;53;1453-1462.
- Boudet J, Buitink J, Hoeskstra FA, Rogniaux H, Larre C, Sator P, Leprince O. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. Plant Physiology; 2006;140;1418-1436.
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Maldonado SB, Guerra MP. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. Brasília: Pesquisa Agropecuária Brasileira; 2009;44;217-224.
- Cesnik R, Miocque J. Histórico. In: Cesnik R, Miocque J. Melhoramento da Cana-de-açúcar. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio Ambiente, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2004; Cap.1;23-30.
- Chanprame S, Kuo TM, Widholm JM. Soluble carbohydrate content of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] somatic and zygotic embryos during development. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant; 1998;34;64-68.
- Chengalrayan K, Abouzid A, Gallo-Meagher M. In vitro regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant; 2005;41;477-482.
- Cidade DAP, Garcia RO, Duarte AC, Sachetto-Martins G, Mansur E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. Rio de Janeiro: Pesquisa Agropecuária Brasileira; 2006;41;385-391.
- Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-Açúcar Safra 2011/2012. Terceiro levantamento. Brasília: Conab; Dezembro/2011. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_12\\_08\\_11\\_00\\_54\\_08.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf). Acessado em: 05 de Jan. de 2012.

Cvikrová N, Binarová P, Cenklová V, Eder J, Machácková I. Reinitiation of cell division and polyamine and aromatic monoamine levels in alfalfa explants during the induction of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*; 1999;105;330-336.

Delrot S, Atanassova R, Maurousset L. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*; 2000;1465;281-306.

Fehér A, Pasternak TP, Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 2003;74;201-208.

Filson PB, Dawson-Andoh BE. Characterization of sugar from model and enzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detection. *Bioresource Technology*; 2009;24;6661-6664.

Flinn BS, Roberts DR, Newton CH, Cyr DR, Webster FB, Taylor IEP. Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiology Plant*; 1993;89;719-730.

Floh EIS, Santa-Catarina C, Silveira V. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese *in vitro*. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*; 2007;13;1992-2001.

Focks N, Benning C. Wrinkled1: a novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiology*; 1998;118;91-101.

Gandonou C, Errabii T, Abrini J, Idaomar M, Chibi F, Senhaji NS. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum sp.*). *African Journal of Biotechnology*; 2005;4;1250-1255.

Geigenberger P, Stitt M, Fernie AR. Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. *Plant Cell & Environment*; 2004;27;655-673.

George EF. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ. *Plant Propagation by tissue culture*. 3ed. Netherlands: Springer; 2008; Cap.1; Vol. 1;1-28.

Gibson SI. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*; 2005;8;93-102.

Gómez-González S, Ruiz-Jiménez J, Priego-Capote F, Castro MDL. Qualitative and quantitative sugar profiling in olive fruits, leaves, and stems by gas chromatography – tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) after ultrasound-assisted leaching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 2010;58;12292-12299.

Grando MF, Franklin CI, Shatters Jr. RG. Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from 'Tifton 9' bahiagrass seed explants for genetic manipulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 2002;71;213-222.

Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa; 1999; Cap. 3; Vol. 2;533-568.

Gutiérrez-Miceli FA, Rodríguez-Mendiola MA, Ochoa-Alejo N, Méndez-Salas R, Ariaas-Castro C, Dendooven L. Sucrose accumulation and enzyme activities in callus culture of sugarcane. *Biologia Plantarum*; 2005;49;475-479.

He Y, Young TE, Clark KR, Kleppinger-Sparace KF, Bridges WC, Sparace SA. Developmental profile of storage reserve accumulation in soybean somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*; 2011;47;725–733.

Ho WJ, Vasil IK. Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L): Growth and Plant Regeneration from Embryogenic Cell Suspension Cultures. *Annals of Botany Company*; 1983;51;719-726.

Hoeneemann C, Richardt S, Kruger K, Zimmer AD, Hohe A, Rensing SA. Large impact of the apoplast on somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* offers possibilities for improved developmental control *in vitro*. *Plant Biology*; 2010;10;77-93.

Iraqi D, Tremblay FM. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugar and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany*; 2001;52;2301-2311.

Krajňáková J, Häggman H, Gömöry D. Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 2009;96;251–262.

Kennedy D, Norman C. What Don't we know? *Science*; 2005;309;5731:75.

Klimaszewska K, Morency F, Jones-Overton C, Cooke J. Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. *Physiologia Plantarum*; 2004;121;682-690.

Kormuták A, Vooková B. Biochemical variation between non-embryogenic and embryogenic calli of *siver fir*. *Biology of Plants*; 1997;39;125-130.

Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*; 2008;228;367-381.

Lakshmanan P. Somatic embryogenesis in sugarcane. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*; 2006;42;201-205.

Lakshmanan P, Geijskes RJ, Aitken KS, Grof CLP, Bonnett GD, Smith GR. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*; 2005;41;345-363.

Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 2008;92;31-45.

Lima MAC, Garcia RO, 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*; 2001;24;73-77.

Lipavská H, Konrádová H. Invited review: Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*; 2004;40;23-30.

Marques D, Villari AC, Lerayer A. Guia da Cana-de-açúcar: Avanço científico beneficia o país. Brasil: Conselho de informações sobre biotecnologia; Set., 2009. Disponível em: [http://www.cib.org.br/pdf/guia\\_cana.pdf](http://www.cib.org.br/pdf/guia_cana.pdf), acessado em 28 de Nov. 2011.

Martin AB, Cuadrado Y, Guerra H, Gallego P, Hita O, Martin L, Dorado A, Villalobos N. Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science*; 2000;154;143-151.

Martin KP, Beegum AS, Zhang CL, Slater A, Madhusoodanan PV. *In vitro* propagation of *Ophirrhiza prostate* through somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum*; 2007;51;769-772.

Mauri PV, Manzanera JA. Somatic embryogenesis of holm oak (*Quercus ilex* L.): ethylene production and polyamine content. *Acta physiologiae plantarum*; 2011;33;717-723.

McCormick AJ, Watt DA, Cramer MD. Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *Journal of Experimental Botany*; 2009;60;357-364.

McCready RM, Guggolz J, Silveira V, Owens HS. Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry*; 1950;22;1156-1158.

Merkle SA, Parrot WA, Flinn BS. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in plants. In: Thorpe TA. *In vitro* Embryogenesis in Plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995; Cap. 5;155-203.

Minocha R, Dale RS, Cathie R, Steele KD, Minocha SC. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*; 1999;105:155-164.

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

Monteiro M, Kevers C, Dommès J, Gaspar T. A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*; 2002;68;3;225–232.

Mordhorst AP, Toonen MAJ, De Vries SC. Plant Embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*; 1997;16;535-576.

Mordocco AM, Brumbley JA, Lakshmanan P. Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum spp.*). *In Vitro Cell & Developmental Biology - Plant*; 2009;45;450-457.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*; 1962;15;473-497.

Natarajan S, Xu C, Caperna TJ, Garrett WM. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Analytical Biochemistry*; 2005;342;214-220.

Nieves N, Sagarra F, González R, Lezcano Y, Cid M, Blanco MA, Castillo R. Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum sp.*) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 2008;95;313-320.

Nieves N, Segura-Nieto M, Blanco MA, Sanchez M, González A, González JL, Castillo R. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*; 2003;39;343-345.

Opsahl S, Bennes R. Characterization of carbohydrates during early diagenesis of five vascular plant tissues. *Organic Geochemistry*; 1999;30;83-94.

Oropeza M, Marcano AK, De García E. Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharum sp.*). *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*; 2001;37;211-216.

Pescador R, Kerbauy GB, Kraus JE, Ferreira WM, Guerra MP, Figueiredo-Ribeiro RCL. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *In Vitro Cell*; 2008;44;289-299.

Pieruzzi FP, Dias LLC, Balbuena TS, Santa-Catarina C, Santos ALW, Floh EIS. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Annals of Botany*; 2011;108;337-345.

Pullman GS, Buchanan M. Identification and quantitative analysis of stage-specific carbohydrates in loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo and female gametophyte tissues. *Tree Physiology*; 2008;28;985–996.

Rapaka VK, Faust JE, Dole JM, Runkle ES. Endogenous carbohydrate status affects postharvest ethylene sensitivity in relation to leaf senescence and adventitious root formation in *Pelargonium cuttings*. *Postharvest Biology and Technology*; 2008;48;272-282.

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*; 2002;69;167-176.

Rodgers KJ, Shiozawa N. Misincorporation of amino acid analogues into proteins by biosynthesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 2008;40;1452-1466.

Rodríguez GR, Costa JHP, Tomat DD, Pratta GR, Zorzoli R, Picardi LA. Pericarp total proteins profiles as molecular markers of tomato fruit quality traits in two segregation populations. *Scientia Horticulturae*; 2011;130;60-66.

Saare-Surminski K, Preil W, Knox JP, Lieberei R. Arabinogalactan proteins in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Physiologia Plantarum*; 2000;108;180-187.

Sánchez-Romero C, Perán-Quesada R, Barceló-Munoz A, Pliego-Alfaro F. Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*; 2002;40;1043–1049.

Santa-Catarina C, Silveira V, Balbuena TS, Viana AM, Estelita MEM, Handro W, Floh EIS. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regulation*; 2006;49;237-247.

Santa-Catarina C, Silveira V, Scherer GFE, Floh EIS. Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 2007;90;91-101.

Santanen A, Simola LK. Changes in polyamine metabolism during somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Journal of Plant Physiology*; 1992;140:475–480.

Santiago AD, Ivo WMPM, Barbosa GVS, Rosseto R. Impulsionando a Produtividade e a Produção Agrícola da Cana-de-Açúcar no Brasil. In: Workshop Internacional sobre Desenvolvimento da Agricultura Tropical. Transformando a Agricultura Tropical: Uma avaliação das Principais Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas. Brasília; 2006; p.1-4.

Santos ALW, Silveira V, Steiner N, Maraschin M, Guerra MP. Biochemical and Morphological Changes during the Growth netics of *Araucaria angustifolia*

Suspension Cultures. Brazilian Archives of Biology and Technology; 2010;53;497-504.

Sghaier B, Bahloul M, Bouzid RG, Drira N. Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: Comparative study. Scientia Horticulturae; 2008;116;169–175.

Sghaier-Hammami B, Drira N, Jorrín-Novo JV. Comparative 2-DE proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic and zygotic embryos. Journal of Proteomics;2009; 73;161-177.

Silveira V, Balbuena TS, Santa-Catarina C, Floh EIS, Guerra MP, Handro W. Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L. Plant Growth Regulation;2004b; 44;147-156.

Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP. 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; 2004a;76;53-60.

Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Floh EIS. 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; 2006;171;91-98.

Silveira V, Steiner N, Santos ALW, Nodari RO, Guerra MP. Biotechnology tolls in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. Crop Breeding and Applied Biotechnology; 2002;2;463-470.

Smeekens S. Sugar-induced signal transduction in plants. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology; 2000;51;49-81.

Snyman SJ, Meyer GM, Koch AC, Banasiak M, Watt MP. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant; 2011;47;234-249.

Steiner N, Santa-Catarina C, Andrade JBR, Balbuena TS, Guerra MP, Handro W, Floh EIS, Silveira V. Review: *Araucaria angustifolia* Biotechnology. Functional Plant Science and Biotechnology; 2008;2;20-28.

Steiner N, Santa-Catarina C, Silveira V, Floh EIS, Guerra MP. Polyamines effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. Plant Cell, Tissue Organs and Cultures; 2007;89;55-62.

Taurus TE, Fowke LC, Dunstan DI. Somatic embryogenesis in conifers. Canadian Journal of Botany; 1991;69;1873-1899.

Veiga CFM, Vieira JR, Morgado IF. Diagnóstico da cadeia produtiva de cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro: relatórios de pesquisa. Rio de Janeiro: FAPERJ,

SEBRAE-RJ; 2006; Cap.1;15-34. Disponível em [http://sistemafaerj.com.br/images/biblioteca/cana\\_vfinal.pdf](http://sistemafaerj.com.br/images/biblioteca/cana_vfinal.pdf). Acessado em: 28 de Nov. de 2011.

Vettore AL, Silva FR, Kemper EL, Souza GM, Silva AM. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Research*; 2003;13;2725-2735.

Vogel G. How Does a Single Somatic Cell Become A Whole Plant? *Sci.*; 2005;309;86.

Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal*; 2003;376;1-14.