

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**CANA-DE-AÇÚCAR: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA,
ORGANOGENESE E O USO DE BIORREACTORES**

MAÍLSON VIEIRA JESUS

DOURADOS

MATO GROSSO DO SUL

2014

**CANA-DE-AÇÚCAR: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA,
ORGANOGENESE E O USO DE BIORREACTORES**

MAÍLSON VIEIRA JESUS

Orientador: Prof.Dr. RODRIGO KELSON SILVA REZENDE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Grande Dourados,
como parte das exigências do curso de
graduação em Agronomia.

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL

2014

CANA-DE-AÇÚCAR: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, ORGANOGÊNESE E O USO DE BIORREATORES

por

Maílson Vieira Jesus

Monografia apresentada com parte dos requisitos para obtenção do Título de
Engenheiro Agrônomo.

Aprovada em: 25/11/2014

Prof. Dr. Munir Mauad

UFGD/FCA

Prof. Dr. Silvia Correa Santos

UFGD/FCA

Prof. Dr. Rodrigo Kelson Silva Rezende

Orientador – UFGD/FCA

Aos meus pais;

Por terem dedicado suas vidas a me criarem, trabalhando arduamente para que eu pudesse realizar este sonho, nunca terei palavras para agradecer tamanho esforço e dedicação.

Obrigado por me amarem e acreditarem em mim!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar saúde, sabedoria e esta grande oportunidade.

Aos meus pais por me apoiarem em todos os momentos para que este trabalho fosse realizado.

À Universidade Federal da Grande Dourados, em especial o curso de Agronomia que sempre me deu apoio.

Agradeço ao meu orientador Prof. Rodrigo Kelson Silva Rezende, pessoa na qual pra sempre vou me espelhar.

Agradeço aos amigos (as): Ederson Marcelo Klein; Guilherme Afonso Schmidt e Pedro José de Souza Comparin por trabalharmos juntos auxiliando nas tarefas desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia em Cana-de-açúcar, realizadas sempre com muita dedicação e descontração.

Agradeço de modo especial, ao amigo Jefferson de Oliveira Barizon pelo apoio moral e força para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	10
3. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE	10
4. CULTURA DE TECIDOS – MICROPROPAGAÇÃO	11
4.1. Planta matriz.....	12
4.2. Contaminação.....	13
4.3. Meio de cultura	13
5. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	14
5.1. Embriogênese somática em cana-de-açúcar.....	15
6. ORGANOGÊNESE	19
6.2. Organogênese em cana-de-açúcar	20
7. BIORREATORES	24
7.1. Biorreatores em cana-de-açúcar	26
8. TRANSGENIA NA CANA-DE-AÇÚCAR	30
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	361
11. APÊNDICES	36

RESUMO

JESUS, Maílson Vieira. **Estudo do cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar sob os aspectos da embriogênese somática, organogênese e o uso de biorreatores**. 2014. 33f.

(Graduação em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS.

A produção mundial de cana-de-açúcar ocorre em mais de 100 países e encontra-se concentrada principalmente na América Latina, África e parte do continente Asiático. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar acarretando a grande importância desta cultura para o país, como geradora de empregos diretos e indiretos. A matéria-prima oriunda dessa cultura atende a diversos setores da produção: açúcar, álcool, alimentação animal, bebidas, entre muitos outros produtos. Com o aumento da demanda interna e da exportação, uma gama de pesquisas e estudos está voltada para os programas de melhoramento. A micropropagação surge como excelente alternativa, na regeneração de plantas e na maximização desses processos, bem como, servindo de base, às técnicas de transformação genética. Torna-se possível o estabelecimento de protocolos eficientes de propagação vegetativa, sob condições controladas, com rapidez de resultados, uniformidade na produção e mudas de excelente qualidade fitossanitária. Objetivou-se então, realizar um levantamento de literatura, abordando a micropropagação de cana-de-açúcar, através das técnicas de embriogênese somática, organogênese e a utilização de biorreatores. Conclui-se que essas técnicas quando bem aplicadas e conduzidas, são de grande contribuição para a regeneração de plantas de qualidade com alta taxa de produção e servindo de base para as técnicas de transformação genética.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*. Cultura de tecidos. Micropropagação.

ABSTRACT

JESUS, Maílson Vieira. **Study of *in vitro* cultivation of sugarcane under the aspects of somatic embryogenesis, organogenesis and the use of bioreactors.** 2014. 33f. (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS.

The world production of sugarcane occurs in over 100 countries and is concentrated mainly in Latin America, Africa and part of Asia. Brazil is the largest producer of cane sugar causing the great importance of this crop for the country as a generator of direct and indirect jobs. The raw material derived from this culture attends various production sectors: sugar, alcohol, animal feed, beverages, among many other products. With the increase in domestic demand and export a range of researches and studies is focused on the improvement programs. The micropropagation emerges as an excellent alternative, plant regeneration and maximizing those processes, as well as serving as a basis for genetic transformation techniques. Becomes possible to establish efficient protocols for vegetative propagation under controlled conditions, with fast results, uniformity of production and plant seedlings of excellent quality. So, it was aimed to conduct a survey of the literature addressing the micropropagation of sugarcane, through the techniques of somatic embryogenesis, organogenesis and the utilization of bioreactors. It is concluded that these techniques when applied and well conducted, are a great contribution to the regeneration of plants with high quality production rate and serving as basis for the techniques of genetic transformation.

Keywords: *Saccharum officinarum*. Tissue culture. Micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

Com o objetivo de quebra do monopólio mundial francês no comércio de açúcar, no século XVII, a cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil. Desde então, a importância dessa espécie vem se tornando cada vez maior. Em meados da década de 70, foi instituído no Brasil, o Programa Nacional do Alcool, objetivando o estímulo da produção e consumo interno, bem como a exportação desse produto (CRESPO, 2007).

A produção mundial de cana-de-açúcar ocorre em mais de 100 países e encontra-se concentrada principalmente na América Latina, África e parte do continente Asiático. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar acarretando a grande importância desta cultura para o país como geradora de cerca de 500.000 empregos diretos e 3,5 milhões de empregos indiretos. A matéria-prima oriunda dessa cultura atende a diversos setores da produção, de açúcar, álcool, alimentação animal, bebidas, entre muitos outros produtos (ÚNICA, 2014).

A área cultivada com cana-de-açúcar que foi colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2013/14 é de 8.811,43 mil hectares, distribuídas em todos estados produtores. São Paulo permanece como o maior produtor com 51,7% (4.552,0 mil hectares) da área plantada, seguido por Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Alagoas com e Pernambuco (CONAB, 2013).

No que tange a produção e exportação de açúcar refinado e álcool combustível, hoje o Brasil é o maior produtor e exportador mundial (CONAB, 2013). A partir dessa importância agroindustrial da cana-de-açúcar, com o aumento do consumo interno e exportação, uma gama de pesquisas e estudos está voltada a esse setor sucroalcooleiro e muitos deles são direcionados e inseridos em programas de melhoramento genético das cultivares com objetivo de as mesmas serem mais produtivas e resistentes a pragas e doenças (CHENGALRAYAN e GALLO-MEAGHER, 2005; MUDRY, 2011).

Entretanto os métodos de melhoramento genético em cana-de-açúcar apresentam alguns problemas que vão desde a influência do ambiente, que possui fatores incontroláveis; o longo período de tempo para se conseguir os resultados podendo levar até 15 anos ou mais e o risco da mistura varietal, obtendo materiais desuniformes. Por

tais motivos a cultura de tecidos e sobre o contexto desse trabalho, a micropropagação surge como excelente alternativa, na regeneração de plantas, na otimização desses processos, bem como, servindo de base, às técnicas de transformação genética, fornecendo protocolos eficientes que apresentam métodos de propagação vegetativa, sob condições controladas, com rapidez de resultados, uniformidade na produção; mudas de qualidade fisiológica e de sanidade, entre outros muitos fatores que demonstram a crescente importância e a necessidade de pesquisas nessas áreas (ALI et al., 2008; ELDESSOKY et al., 2014).

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo, realizar um levantamento de literatura, abordando a micropropagação em cana-de-açúcar através das técnicas de embriogênese somática, organogênese e a utilização de biorreatores.

3. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

Segundo Cronquist (1981), a cana-de-açúcar encontra-se classificada da seguinte maneira:

Divisão: Magnoliophyta;

Classe: Magnoliopsida;

Ordem: Graminales;

Família: Poaceae;

Gênero: *Saccharum*;

Espécies: *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinensis*, *saccharum barberi* e *Saccharum robustum*.

Quando a cana-de-açúcar entra em contato com o solo e este oferece condições favoráveis de umidade e temperatura, vai brotar através da gema, que desenvolverá novos colmos. Concomitantemente a germinação, há a ocorrência da emissão das raízes (FERNANDES, 1984).

A planta então formada se desenvolve em forma de touceira tendo sua parte aérea constituída de colmos, que possuem formato cilíndrico, apresentando nós e entrenós, hábito de crescimento ereto levemente decumbente (FERNANDES, 1984; MOZAMBANI et al., 2006). Os nós são formados por anel de crescimento (zona de multiplicação), cicatriz foliar, zona radicular e a gema. O internódio é a região situada entre dois nós, podendo variar o seu diâmetro entre 2 e 3 cm. A depender da variedade pode apresentar rachaduras (MOZAMBANI et al., 2006).

As folhas quando completas são constituídas de lâmina foliar, bainha e colar. De acordo com o genótipo podem variar, em ereta e rígida, com sardas ou pelos, por exemplo, bem como variam em seu comprimento e largura (MOZAMBANI et al., 2006). São alternadas e possuem bainha invaginante. Quanto ao comprimento podem ter entre 60 a 150 cm e largura de 2,5 a 10 cm (FERNANDES, 1984). A inflorescência é do tipo panícula aberta, dita bandeira ou flecha, que possui um eixo principal denominado, raque. As flores são hermafroditas. O gineceu é formado por um ovário com um único óvulo e o androceu possui três estames e anteras com os grãos de pólen (MOZAMBANI et al., 2006).

A cana-de-açúcar é uma planta do tipo C4, apresentando alta taxa fotossintética e eficiência no aproveitamento do CO₂. Tem a característica de ser adaptada às condições de alta intensidade luminosa, altas temperaturas e estação seca com temperaturas baixas na fase de maturação, ou seja, ideal para o cultivo em regiões tropicais (SEGATO et al., 2006).

4. CULTURA DE TECIDOS – MICROPROPAGAÇÃO

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como uma reunião de técnicas objetivando o isolamento de um explante, que pode ser uma célula, tecido ou órgão, a

ser cultivado em condições assépticas sobre um meio nutritivo artificial. Levando assim em consideração a “totipotencialidade” das células vegetais, ou seja, as mesmas possuem toda a informação genética necessária para a regeneração de uma planta completa (PASQUAL et al., 1998).

Uma das técnicas da cultura de tecidos, denominada micropropagação, nada mais é do que a propagação vegetativa *in vitro* e devido ao tamanho dos propágulos trabalhados é que se justifica o seu nome. Por ser muito prática, se destaca dentre as outras técnicas sendo utilizada em larga escala (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). De uma maneira geral, a micropropagação é recente tanto no que tange a pesquisa, mais ainda na perspectiva comercial, porém é realidade crescente no mundo, inclusive no Brasil, principalmente na produção de mudas, porta-enxertos, limpeza clonal, certificações, etc. As vantagens são inúmeras como a manutenção das características da planta matriz; alto rendimento devido ao tamanho dos propágulos; controle total das tarefas e das condições ambientais da propagação; produção intensiva; clonagem, preservação e contribuição direta ao melhoramento genético, porém deve ser conduzida sob protocolos desenvolvidos e de forma minuciosa, para atingir seu real objetivo, sendo assim dada a importância das pesquisas a serem realizadas (GRATTAPAGLIA; MACHADO; PASQUAL, 1998).

4.1 Planta matriz

A planta que servirá como fonte de explantes, deve encontrar-se em idade adequada, ou seja, plantas jovens resultam em explantes de melhor qualidade para a micropropagação, pois quanto mais velho for o material, maior é a quantidade de compostos fenólicos produzidos pelo mesmo, resultando em oxidação desse explante. A separação dos mesmos deve ocorrer de brotações novas, ou seja, de regiões meristemáticas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em cana-de-açúcar tem se apresentado dois tipos de explantes como principais nas técnicas de micropropagação, são eles segmentos transversais de folhas imaturas,

em torno de 4 mm e meristemas isolados também de plantas jovens (BEHERA e SAHOO, 2009; MUDRY 2011).

4.2 Contaminação

Para se atingir o sucesso na micropropagação se faz necessário que o material obtido encontre-se descontaminado, ou seja, em excelente estado de sanidade, sem infecções por microrganismos patogênicos. Para isso são utilizados vários métodos desde a produção das plantas matrizes em condições fitossanitárias excelentes e posteriormente feita a assepsia utilizando substâncias de ação germicida, como etanol, hipoclorito de sódio, entre muitas outras (GRATTAPAGLIA; MACHADO; PASQUAL, 1998). Nos procedimentos de isolamento dos explantes e inoculação dos mesmos tudo deve estar sob condições de máxima higiene e assepsia, o ambiente, os instrumentos de trabalho, a pessoa que o conduzirá, portanto processos como autoclavagem, flambagem, esterilização, se tornam fundamentais na eliminação e proteção contra os contaminantes (PASQUAL et al., 1998).

Dentre os trabalhos encontrados em micropropagação de cana-de-açúcar, se observou que os métodos de assepsia seguiram de certa forma um padrão tendo como base a imersão dos explantes em álcool 70% por um minuto e em hipoclorito de sódio 2,5% variando o tempo de 5 a 30 minutos, seguido de três lavagens com água destilada estéril (ALMEIDA; MUDRY, 2011).

4.3 Meio de cultura

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), existem diversos meios de cultura sobre os quais os explantes podem se desenvolver. O meio que mais se aproxima de um conceito padrão é o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), apresentando bons resultados, podendo sofrer modificações e diluições conforme o objetivo do ensaio.

Os reguladores de crescimento têm grande importância quanto à sua utilização nos meios nutritivos, variando conforme espécie, o explante e os objetivos. Essas substâncias sintéticas servirão com finalidades semelhantes às dos fitohormônios, atuando no direcionamento do metabolismo do explante (PASQUAL et al., 1998). As auxinas quando em maiores concentrações que as citocininas, promovem a formação de raiz, em contrapartida, em situação inversa, há a formação de brotações. As giberelinas estão ligadas ao alongamento dos internódios (TAIZ; ZEIGER, 2004).

5 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese pode ser conceituada como um método de propagação vegetativa a partir da formação de embriões oriundos de tecido somático. Contudo estes embriões não são provenientes de cruzamento de gametas de seus progenitores, portanto seu genótipo é idêntico à planta matriz (PASQUAL et al., 1998). A embriogênese somática pode ser natural ou *in vitro*, neste segundo caso, também chamada de induzida, as células dos tecidos embrionários, podem receber estímulos ambientais e/ou químicos e assim se tornarem competentes ou se direcionarem em competências morfogenéticas distintas (GUERRA et al., 1998).

Em abordagem generalista, a técnica de embriogênese somática induzida, nada mais é que, a separação de explantes e posteriormente se realizar a inoculação dos mesmos, em meio de cultura, acrescido de reguladores de crescimento, resultando na formação de uma planta (PASQUAL et al., 1998). Esta por sua vez, é resultado de um embrião somático, conhecido como um novo indivíduo originado de células individuais ou em pequeno grupo do explante, bem desenvolvidas, com citoplasma denso e núcleo grande (PASQUAL et al., 1998). De acordo com Guerra et al. (1998), os embriões somáticos são diferidos dos propágulos da organogênese, pois possuem bipolaridade, ou seja, ápice caulinar e ápice radicular e a característica citada à cima de não haver ligação vascular com os tecidos do explante inicial.

Existem duas vias pelas quais são originados os embriões somáticos, que divide a embriogênese em direta e indireta. A primeira via tem maior frequência *in vitro* e é

caracterizada pela origem dos embriões de forma direta, ou seja, sem fases intermediárias de formação de calos. As células que serão responsáveis por este modelo são denominadas células pré-embriogênicamente determinadas (PEDCs) e são encontradas na antera, em partes do ovário ou plântulas jovens, por exemplo. Já pela via indireta, onde há a formação do crescimento desorganizado de células (calos), como uma fase intermediária à formação dos embriões, para tal formação, as células devem passar por processo de indução e então são ditas, células embriogênicas determinadas (IEDCs) (PASQUAL et al., 1998).

Segundo Herculano et al. (2009), a técnica da embriogênese somática possui grande dependência genética, portanto se faz exigente quanto a adequar alguns fatores como, meio e sistemas de cultivo, tipos de explantes, para que haja viabilização da mesma. Quando isso ocorre, são inúmeras as vantagens destacando a produção em larga escala de embriões, ocupando um pequeno espaço e a contribuição para programas de transformação genética.

5.1 Embriogênese somática na cana-de-açúcar

Uma das primeiras espécies regeneradas *in vitro* com sucesso foi a cana-de-açúcar (BARBA e NICKELL, 1969; MUDRY, 2011). A partir de então muitos trabalhos foram desenvolvidos em embriogênese somática.

Gill et al. (2006) e Mudry (2011), relatam que os explantes utilizados na formação de calos embriogênicos, são em sua maioria obtidos de plantas com 6 a 15 meses de idade, a partir de suas folhas jovens, ou seja, dos palmitos, que por sua vez são seccionados em segmentos, formando “discos”. Foram encontrados também trabalhos utilizando outros tipos de explantes, com segmentos de inflorescências imaturas (DESAI et al., 2004), segmentos da bainha das folhas (FRANKLIN et al., 2006) e também trabalhos com sementes (CHENGALRAYAN e GALLO-MEAGHER, 2005).

Consuetudinariamente a indução de calos embriogênicos vem sendo realizada em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Os reguladores de crescimentos influenciam nas diferentes respostas dessa indução, principalmente as

auxinas. Os mais habitualmente utilizados são ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinecarboxílico (Picloram) (CHENGALRAYAN e GALLO-MEAGHER, 2005; GARCIA et al., 2007), ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenxozóico (Dicamba) (KHAN et al., 2008) e o ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (MUDRY, 2011; BLANCO et al., 1997; GANDONOU et al., 2005).

A resposta morfo genética de materiais de cana-de-açúcar tem sua distinção apresentada claramente pela influência dos genótipos, ou seja, cada cultivar se comportará diferentemente, comportamento este justificado pela cana-de-açúcar ser um híbrido interespecífico (CIDADE, et al., 2006; MUDRY, 2011). A exemplo disso que foi exposto, Lima et al. (2001) apresentam a diferença nos tipos de calos formados por duas variedades e a capacidade das mesmas em regenerar plantas, sendo como resultado um dos materiais formando calos mucilaginosos, não havendo a formação de plantas e em contra partida o outro material apresentou grande capacidade na formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da resposta morfo genética de segmentos de folha imatura de *Saccharum officinarum* L. (variedades RB739735 e RB72454) cultivadas em meio MS suplementado por 2,4-D a 9 μ M, Lima, 2001.

Variedade	Indução de Calos	Regeneração	Nº médio de plantas/calos
RB739735	140/200 (70%)	44/80 (56%)	50 \pm 8
RB72454	80/80 (100%)	0/60 (0%)	0

Nove genótipos (CP59-73, CP63-588, CP80-314, SP71-1081, F160, L62-96, CP70-321, CP57-614 e Clone III), foram testados por Gandonou et al. (2005), sendo os explantes segmentos do palmito, em meio MS com 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D, as respostas dos mesmo quanto à a capacidade da indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas houveram diferenças significativas, demonstrando a dependência desses fatores dos genótipos (Figura 1).

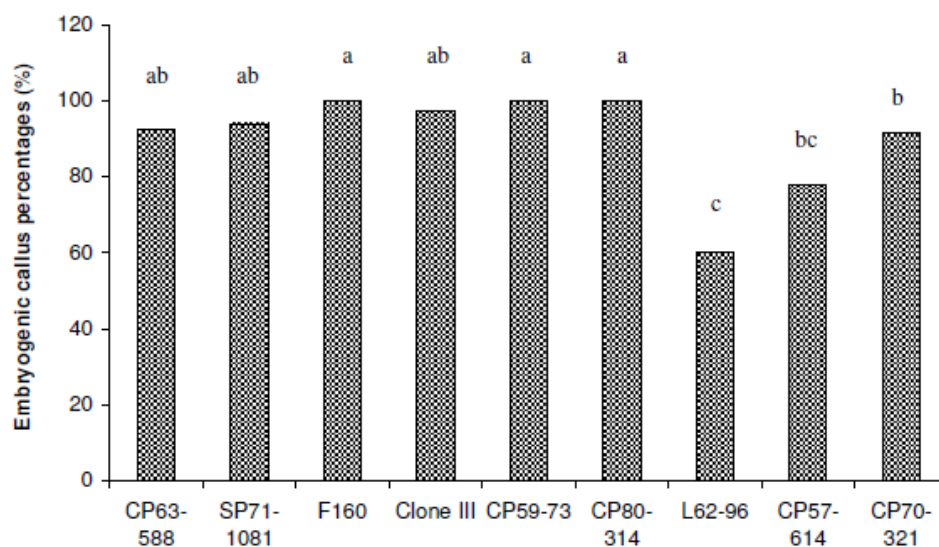


FIGURA 1. Porcentagem de calos embriogênicos de nove genótipos de cana-de-açúcar, depois de 4 semanas de cultura. Valores com mesma letra não diferem entre si em $p < 0,05$. Gandonou, 2005.

A literatura traz o destaque para a utilização da auxina 2,4-D como o regulador mais empregado em estudos e de melhores resultados na indução da formação dos calos embriogênicos e também sua relação com os genótipos, sendo acrescida ao meio de cultura. A auxina 2,4-D foi testada em diferentes doses por Almeida (2011), que em três cultivares (RB867515, RB855156 e RB72454), obteve o melhor resultado para a concentração de 3,0 e 7,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Entretanto manter por períodos prolongados os embriões sob esse regulador de crescimento é prejudicial para o desenvolvimento futuro de calos nos subcultivos. De acordo com Cidade et al. (2006), de três a cinco meses de subcultivos com 2,4-D presente, houveram perdas significativas na capacidade de regeneração dos calos restringindo a utilização desses materiais para a transformação genética, pois não ocorreu formação das plantas transformadas.

Mudry (2011), em sua pesquisa realizou o teste com diferentes concentrações de 2,4-D (1, 3, 9, 16 e 27 μM) para a indução de calos embriogênicos no clone RB986419 e na cultivar RB966928 de cana-de-açúcar. Os explantes foram obtidos de plantas com 10 meses de idade e os segmentos transversais de folhas imaturas, padronizados em 8 x 4 mm. Após inoculação seguiu-se o padrão para a incubação, com a temperatura de 25°C ± 2°C. Para o clone houve a formação de 26% de calos embriogênicos, quando na

concentração de 9 μM de 2,4-D. A cultivar apresentou a formação dos calos embriogênicos nas concentrações 9, 16 e 27 μM de 2,4-D com a porcentagem de formação de 24, 30 e 18% respectivamente. Com esses resultados pôde-se observar a interação entre genótipo e concentrações da auxina na quantidade de calos formados.

Menezes et al. (2012), verificaram que na ausência de 2,4-D não houve a formação de calos e nas concentrações de 1,0 a 6,0 mg L^{-1} houve 100% de formação. As médias de tamanhos dos calos foram maiores quanto maior era a concentração de 2,4-D (Figura 2). Esse fato foi também verificado por (SILVA et al., 2009).

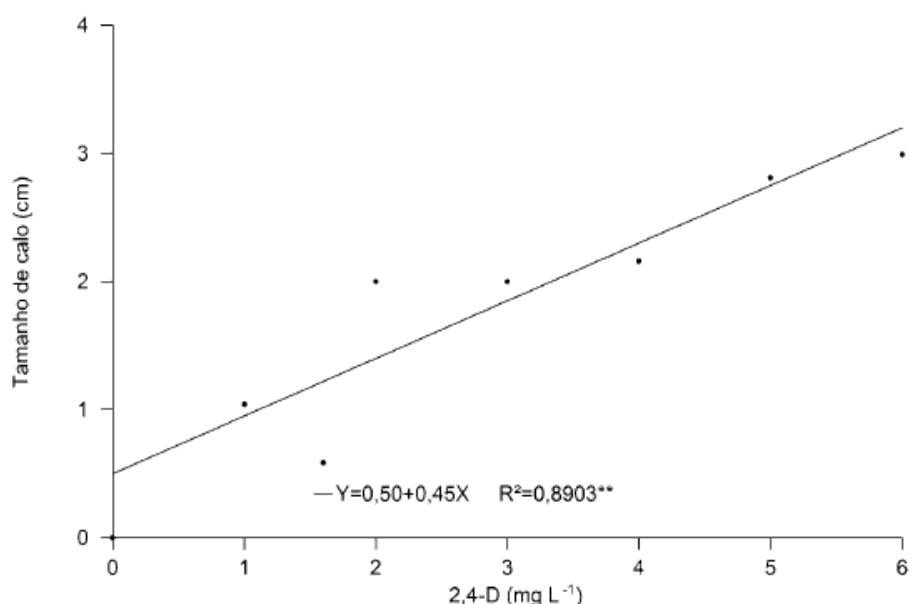


FIGURA 2. Indução de calos (cm) de cana de açúcar (*Saccharum* spp.) cultivar RB 931003 em função das diferentes concentrações 2,4 D. Menezes, 2011.

Desai et al. (2004), realizaram um trabalho interessante. Apresentaram uma alternativa para o tipo de explante, utilizando segmentos (3-6 mm) de inflorescências imaturas da cultivar, CoC-671 com 10 meses de idade. Inoculados em meio MS padrão acrescido com diferentes reguladores e concentrações dos mesmos e incubados a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A resposta máxima a embriogênese somática foi de 54,09% contendo 0,5 mg L^{-1} de ANA e 2,5 mg L^{-1} de Cinetina. A partir de 24 explantes obtiveram entre 185-200 plantas regeneradas.

Apesar de serem pouco estudados, dois fatores que influenciam na embriogênese somática em cana-de-açúcar são, a luminosidade e a temperatura. Em cana-de-açúcar a embriogênese somática ocorre preferencialmente em condições de ausência de luz onde há maior formação dos calos embriogênicos nesta condição em detrimento à condição com intensidade luminosa. Este fato foi mostrado por Silva et al. (2009), onde segmentos de folhas imaturas foram inoculados e posteriormente submetidos a incubação de fotoperíodo de 16 horas e na condição de escuro. A formação de estruturas embrionárias foi observada quando na condição de escuro, resultado este, justificado pelo poder inibidor da luminosidade na divisão celular inicial e no favorecimento da produção de compostos fenólicos interferindo nos reguladores de crescimento, também observado neste trabalho. Em relação à temperatura, Ali et al. (2008), tiveram melhores resultados na indução e ploriferação de calos embriogênicos a temperatura aproximada de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6 ORGANOGÊNESE

O processo *in vitro* de indução e formação de novos órgãos como brotos e raízes, que nessas condições são chamados de órgãos adventícios, a partir de outros órgãos ou tecidos, é denominado de organogênese. Esses tecidos ou órgãos capazes de sofrer organogênese são denominados organogênicos e as células que possuem a característica particular ou a adquirem por estímulos exógenos, de se diferenciar para a organogênese, são ditas ‘competentes’ (PASQUAL et al., 1998).

Ainda segundo o mesmo autor a organogênese pode ser conduzida e desenvolvida de maneira direta e indireta. A organogênese direta ocorre quando a partir do explante separado da planta-matriz, novos brotos ou raízes são formados sem que haja uma fase intermediária de formação de calos. Este padrão de organogênese é de difícil ocorrência sendo esse potencial resultado da influência da parte da planta de onde o explante é obtido. O novo órgão é proveniente de meristemas formados sobre o tecido inoculado ou a partir de uma ou mais células epidérmicas que se especializam possuindo citoplasma denso e núcleo grande, são então denominadas ‘meristemóides’.

A organogênese indireta consiste na via em que há uma etapa intermediária, onde há a formação de calos não-organizados, favorecidos pelo meio de cultura, entretanto este meio não necessariamente induzirá à formação de meristemas organogênicos, sendo a troca para outro meio, onde será expressa a competência dessas células, quase sempre necessária. Os reguladores de crescimento dependendo de seu ajuste, ou seja, concentrações e combinações vão influenciar diretamente na formação de brotações e/ou de raízes, sendo a manutenção de suas propriedades afetadas conforme o número de subcultivos. Após então o estabelecimento dos calos os mesmos são isolados e então será realizada a subdivisão dos mesmos ou a preparação de suspensão celular (PASQUAL et al., 1998). Entretanto a distinção entre essas duas vias é dificultosa, já que muitas das vezes elas ocorrem concomitantemente em um mesmo tecido (NOGUEIRA, 2013).

6.2. Organogênese em cana-de-açúcar

A organogênese em cana-de-açúcar tem sido menos explorada em relação a embriogênese somática, contudo não se faz menos importante até mesmo como posterior modo de regeneração de plantas após o cultivo de calos embriogênicos, complementando o processo do cultivo *in vitro*. Os diferentes genótipos apresentados pelas cultivares de cana-de-açúcar também apresentam distinção nas respostas a determinados fatores que tangem a organogênese (ALMEIDA, 2011).

Quanto às plantas que servirão de fonte para explantes, tem sido usadas plantas de 6 a 15 meses de idade. Para a formação tanto de brotos quanto de raízes são usados segmentos transversais de folhas imaturas formando “discos” e o meristema isolado de gemas axilares (SEEMA, 2011; NOGUEIRA, 2013; SMIULLAH, 2013;). O meio de cultura sobre o qual se desenvolve a organogênese em cana-de-açúcar tem sido habitualmente o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de reguladores de crescimento em diferentes concentrações e combinações, se destacando a preferência pela combinação de auxinas e citocininas, mas também podem ser encontrados trabalhos com alguma combinação com giberelinas (SEEMA, 2011; ALI, 2008).

Almeida (2011), apresenta um trabalho bastante completo, no qual induziu segmentos transversais de folhas imaturas, de 2-3 mm, à organogênese direta de três cultivares: RB855156; RB867515 e RB72454, contendo combinações da auxina ANA (ácido naftaleno-acético); das citocininas: Cinetina (6-furfurilamino-purina) e BAP (6-benzilaminopurina) em diferentes concentrações e tempo de incubação. Os melhores resultados para a formação de brotos por organogênese direta foram obtidos pela cultivar RB 8855156 usando combinações de ANA e Cinetina incubados por 45 dias, demonstrando as influências e relações entre genótipo, reguladores e tempo de incubação (Figura 3).

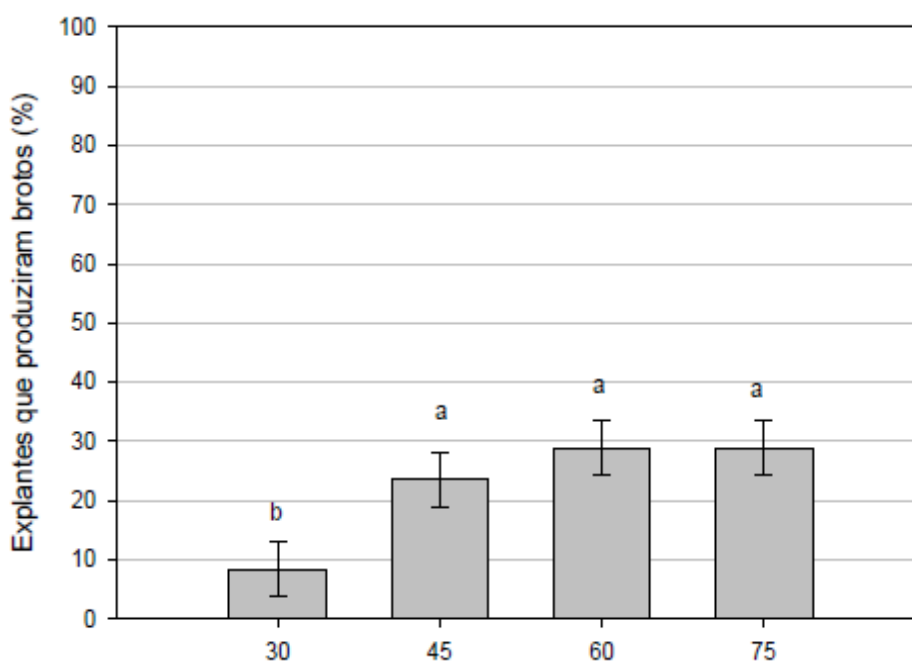


FIGURA 3. Organogênese direta da cultivar RB855156 obtida após quatro diferentes tempos em meio de indução suplementado com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento. Em cada categoria, valores com a mesma letra não diferem pelo Teste de Duncan ($P < 0,05$). Curitiba, UFPR, 2011.

Nogueira (2013), realizou um estudo para verificar o potencial organogênico de 22 variedades brasileiras de cana-de-açúcar, no qual foram inoculados segmentos transversais de folhas imaturas em meio de cultura contendo, ANA e Cinetina, nas

concentrações $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente, sob 40 dias de incubação. Os resultados mostraram claramente a distinção entre os genótipos e seu potencial morfogênico, (Tabela 2). Neste trabalho a organogênese foi desenvolvida tanto por via direta, quanto por via indireta, sendo que a maioria dos materiais produziram brotos e raízes.

Outras auxinas como: AIB (ácido indolbutírico) e Picloram (ácido-4-amino-3, 5,6-tricloropicolínico) e a giberelina, GA3 (ácido giberélico) em combinação com BAP, foram testados por Ali et al. (2008) e Seema et al. (2011) e obtiveram bons resultados.

A organogênese também é influenciada pelas condições ambientais de incubação, ou seja, temperatura e luminosidade, porém claramente a ação dos reguladores de crescimento e o tipo de explante são os temas mais abordados nos trabalhos encontrados. Contudo um trabalho muito interessante foi desenvolvido por Rocha et al. (2013), onde os mesmos experimentaram a organogênese de cana-de-açúcar usando diodos emissores de luz (LEDs), emitindo luz azul, verde e vermelha, substituindo as lâmpadas fluorescentes brancas e a adequação de concentrações de sacarose. As melhores concentrações de sacarose foram $33,9 \text{ g L}^{-1}$ sob LEDs azuis; $36,4 \text{ g L}^{-1}$ sob LEDs verdes; $35,2 \text{ g L}^{-1}$ sob LEDs vermelho e $31,9 \text{ g L}^{-1}$, sob a ação das lâmpadas fluorescentes brancas.

Tabela 2. Percentagem de explantes das variedades de cana-de-açúcar que apresentam oxidação fenólica, formação de raízes adventícias e calo na base durante o cultivo em meio de cultura MS + 5,0 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de KIN. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 2001.

RB 951541	4,1 c	4,7 b	62,0 a
RB 93509	0,0 c	4,6 b	61,5 a
RB 92579	14,0 c	4,7 b	66,5 a
CB 98710	22,1 c	3,6 b	29,5 b
SP 813804	16,5 c	6,6 b	56,4 a
SP 701143	45,6 b	16,5 b	41,2 b
SP 791011	8,2 c	24,7 b	41,2 b
RB 921003	44,3 b	44,0 a	22,0 c
SP 813250	59,6 b	6,6 b	6,6 b
RB 83160	28,4 c	23,5 b	37,8 b
CB 45-3	49,8 b	38,5 a	44,0 b
RB 863129	59,7 b	23,2 b	16,5 c
SP 841431	33,0 c	46,4 a	6,6 c
SP 854594	79,9 a	39,7 a	9,9 c
RB 845210	83,3 a	50,0 a	8,2 c
VAT 90-186	66,5 a	38,8 a	11,0 c
VAT 90-212	73,2 a	36,4 a	6,6 c
SP 716149	76,6 a	63,3 a	9,9 c
RB 99395	29,6 c	20,6 b	12,3 c

*Médias seguidas por mesma letra, pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

7 BIORREATORES

Os biorreatores são definidos como equipamentos e recipientes nos quais ocorrerá uma reação biológica, sendo muito utilizados para os processos de micropropagação de plantas (GESSIEL, 2008). A principal função e objetivo dos biorreatores consistem em apresentar um ambiente controlado físico e quimicamente, asséptico e de fácil trabalho, com ótimas condições para o crescimento e desenvolvimento dos materiais vegetais em meio nutritivo e em larga escala. O processo pode ser por dois sistemas, pela imersão temporária ou imersão permanente (PAEK et al., 2001; GESSIEL, 2008).

A micropropagação realizada sem o uso de biorreatores carrega consigo algumas desvantagens como a alta demanda de mão-de-obra resultando no encarecimento das mudas produzidas, além disso, a alta manipulação do material feita por esta mão-de-obra acarreta em grandes perdas por contaminação e mistura varietal. Assim o desenvolvimento e emprego de biorreatores para o cultivo *in vitro*, se apresentam como alternativa benéfica na redução do custo, perdas do processo, aceleração do mesmo, é um sistema adaptável a diversas espécies vegetais, contribui na uniformização da produção, é simples e elimina o estresse gasoso e mecânico (TAKAYAMA e AKITA, 1994; TEIXEIRA, 2002).

Entretanto, o uso de biorreatores apresenta também desvantagens, que possuem a mesma raiz problemática da micropropagação pelo método convencional. Talvez os maiores obstáculos sejam os problemas com contaminação e oxidação dos materiais vegetais. Em se tratando das contaminações, essas podem ser divididas em dois grupos: as endógenas, que são as de mais difícil verificação, normalmente causadas por bactérias e vírus, e as contaminações exógenas causadas por microrganismos provenientes do ambiente, do solo ou do corpo humano, por exemplo. O controle dessas contaminações está ligado desde o planejamento e projeto do local de trabalho, das condições fisiológicas das plantas que servirão de fontes para explantes e principalmente da qualidade de mão-de-obra, que deve conhecer e praticar toda metodologia de forma higiênica e correta (RIBEIRO e BASTOS, 2008).

Ainda de acordo com Ribeiro e Bastos (2008), a respeito da oxidação fenólica, essa é originada por enzimas oxidativas expressadas devido à injúria causada nas células e na presença de oxigênio. Portanto, a oxidação pode ser minimizada utilizando sempre materiais mais jovens, manutenção cautelosa dos explantes, cultivo no escuro ou com baixa intensidade luminosa, entre outras técnicas que podem ser aplicadas.

Os biorreatores tem seu funcionamento definido por tubos que podem ser constituídos de vidro ou silicone, pelos quais é conduzido, ar e meio de cultura, condução esta por aspersão ou borbulhamento (RIBEIRO e BASTOS, 2008).

São inúmeros os modelos de biorreatores existentes e que tem a possibilidade de seu emprego na cultura de tecidos vegetais. Contudo, ainda não se têm definido quais modelos são mais eficientes em determinadas situações, porém é crescente o estudo e desenvolvimento desses equipamentos, com resultados promissores (SILVA, 2006). Ribeiro e Bastos (2008), são apresentados os diferentes tipos de biorreatores:

Biorreatores de imersão permanente (BIPER) – utilizado principalmente no cultivo de células vegetais, pois se cultivados tecidos, esses podem sofrer hiperhidratação, devido o material ficar permanentemente em contato com o meio líquido, causando distúrbios fisiológicos.

Biorreatores de imersão temporária – também conhecido como Sistema de Imersão Temporária. Neste caso o material vegetal fica imerso temporariamente no meio de cultivo. O procedimento se dá por dois frascos dispostos lado a lado (RITA[®]) ou sobrepostos (BIT[®]) (Figura 4), tubos autoclaváveis, filtros de ar, válvulas elétricas e compressores. Em um frasco encontra-se o meio de cultura, enquanto no outro as futuras plantas cultivadas. O tubo conectando esses frascos conduz o meio de cultura, impulsionado pela compressão do ar para o frasco contendo as plantas, por tempo desejado e então o meio retorna ao primeiro frasco.

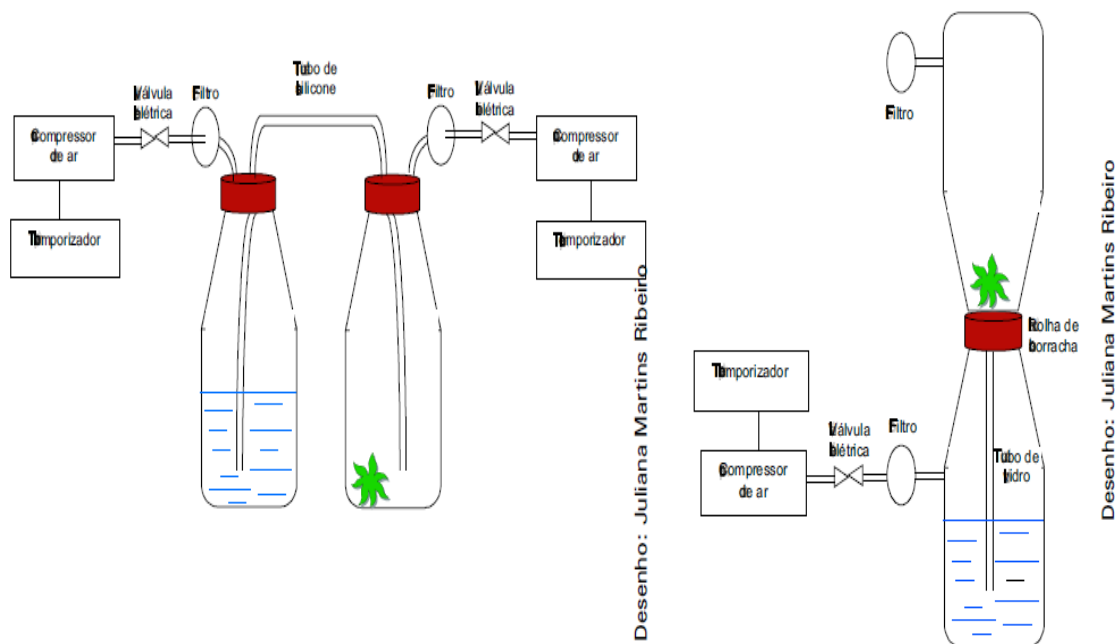


FIGURA 4. Esquema ilustrativo de um biorreator de imersão temporária RITA® (à esquerda) e BIT® (à direita). EMBRAPA – Semi-Árido, Petrolina, 2008.

O controle dessa operação fica a cargo de temporizadores que são programados previamente determinando a frequência, ou seja, número de imersões diárias e o tempo de cada imersão (RIBEIRO e BASTOS, 2008). Segundo Paek et al. (2001), os fatores que influenciam a micropropagação em biorreatores são: o pH do meio de cultura, interferindo nos processos fisiológicos e desempenho da cultura; a quantidade de oxigênio e gás carbônico, importante sempre ser medida e monitorada e o tempo e frequência de imersão.

7.1 Biorreatores na cana-de-açúcar

Os estudos e pesquisas utilizando biorreatores em cana-de-açúcar ainda não são encontrados em abundância, porém pode se considerar que trabalhos desenvolvidos por Lorenzo et al. (1998) são um dos pioneiros testando cultivares de cana-de-açúcar e seu potencial na formação de brotos, corroborando com os métodos de micropropagação convencional e sob as condições do sistema de imersão temporária. Relatam os autores

que os tratamentos com biorreatores mostram claramente um incremento na formação dos brotos e melhor eficiência posterior no processo de aclimatização.

Melo et al. (2014), avaliaram a adaptação ao estresse salino da variedade RB98710 e para tal, utilizaram biorreatores de imersão temporária na micropropagação desse material. O ciclo de imersão consistiu em oito imersões diárias de dois minutos cada e um litro de meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com Cinetina e BAP, $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente.

Lorenzo et al. (1998), foram um dos pioneiros a estabelecerem um protocolo para a cana-de-açúcar na formação de brotos em sistema de imersão temporária. A metodologia foi aplicada a cultivar C-1051-73. Os explantes foram submetidos a 50 ml de meio de cultura por explante com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ paclobutrazol por 30 dias e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 por 15 dias para a indução e alongação de brotos. A imersão consistiu em transferir o meio de cultura do recipiente de meio para o recipiente contendo as plantas. O tempo de imersão foi de 2 minutos. Passado esse tempo o meio foi transferido novamente para o recipiente de meio. Ao corroborar com os métodos de imersão permanente, único método antes testado, os autores alcançaram o dobro de produção como resultado.

Um recente trabalho apresentado por Maluta et al. (2013), objetivou a avaliação de diferentes comprimentos de ondas luminosas no desenvolvimento *in vitro* de mudas de cana-de-açúcar. Foram avaliadas quatro combinações de LED, nas cores: T1 (100% vermelha); T2 (100% azul); T3 (70% azul + 30% vermelha); T4 (70% vermelha + 30% azul), e para o controle foi utilizada a luz branca fluorescente. Os resultados indicaram que a luz vermelha proporcionou menores competições entre os explantes beneficiando diretamente a propagação *in vitro* com o biorreator, pois essa menor competição acarreta em maior produção.

8. TRANSGENIA NA CANA-DE-AÇÚCAR

Os objetivos em se desenvolver estudos e técnicas de transformação genética em cana-de-açúcar envolvem a resistência ao estresse hídrico; resistência a pragas e

doenças entre outros fatores, que permeiam o aumento da produção como um todo (MOLINARI, 2006). Essa transformação pode ser via direta, pela técnica da biobalística ou por via indireta utilizando a *Agrobacterium tumefaciens* e *rhizogenes* como carreadoras do DNA exógeno de interesse (LIMA et al., 2001).

Os primeiros relatos de transformação genética em cana-de-açúcar são apresentados por Bower e Birch (1992), utilizando biobalística com o gene utilizando o gene *nptII* o qual codifica a enzima neomicina fosfotransferase II, resultando na resistência aos antibióticos canamicina e geneticin. Também no mesmo ano Chowdhury; Vasil com a biobalística bombardearam o gene *bar* em calos embriogênicos da cana-de-açúcar. Desde então é crescente a quantidade de trabalhos e seus diferentes objetivos na obtenção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar, resistência a herbicidas (FALCO et al., 2000; MANICKAVASAGAM et al., 2004), insetos (ARENCEBIA et al., 1998), vírus do mosaico (BUTTERFIELD et al., 2002) e estresse hídrico (ZHANG et al., 1999; MOLINARI, 2006).

Arencibia et al (1998) testaram a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* na transformação genética de cana-de-açúcar, porém não obtiveram resultados satisfatórios devido esta bactéria não ter monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar, como hospedeiros

Tanto o método a partir da biobalística quanto o método indireto utilizando bactéria apresentaram problemas. O primeiro devido a sua complexidade de integração gerando instabilidade na inserção do gene. O segundo, por sua vez, foi afetado devido a adequação de protocolos para esta técnica (MOLINARI, 2006).

Para justificar o que foi exposto neste trabalho a respeito do uso das técnicas de micropropagação em conjunto às de transformação genética, Molinari (2006), avaliou a resposta ao estresse hídrico de plantas de cana-de-açúcar RB855156 transformadas com um gene heterólogo *P5CS*, que codifica a enzima prolina, através de bombardeamento de partículas usando gene marcador *bar*. O bombardeamento foi sobre calos embriogênicos derivados de segmentos transversais de folhas imaturas micropropagadas e após as análises laboratoriais, também utilizaram da micropropagação para a regeneração de plantas a serem levadas para a fase de aclimatização (Figura 5).

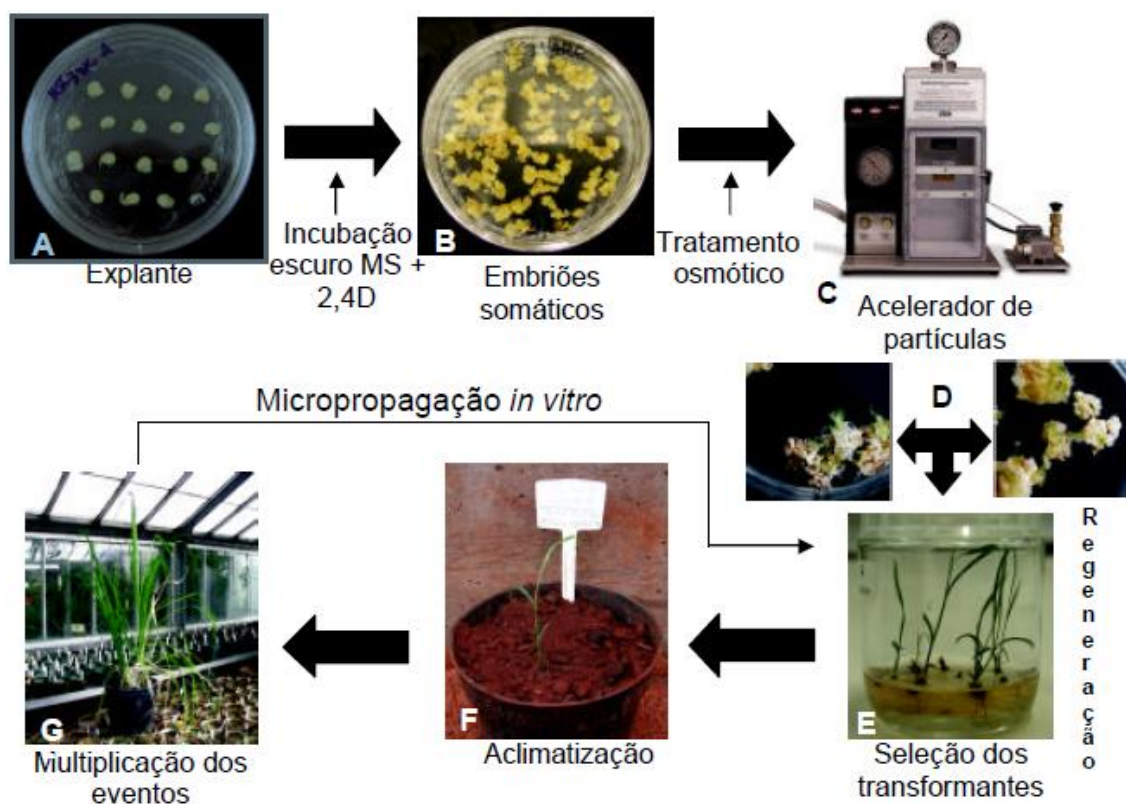


FIGURA 5. Esquema de regeneração e transformação de cana-de-açúcar. A – Explantes de folhas imaturas com 2-3 mm; B – Calos embriogênicos obtidos após 4 subcultivos em meio MS acrescido de 13 μM de 2,4-D; C – Aparelho de bombardeamento PDS-1000/He usado nos experimentos de transformação genética da cana-de-açúcar; D – Etapa de regeneração dos calos embriogênicos em meio de cultura contendo 25 μM de glufosinato de amônio; E – Alongamento e enraizamento das plantas putativas transgênicas de cana-de-açúcar; F – Fase de aclimatização das plantas em casa-de-vegetação; G – Fase de multiplicação dos eventos. Curitiba, UFPR, 2006.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado ampliou o conhecimento em relação à cultura de tecidos, a micropropagação e suas técnicas. Pôde ser observada a contribuição desses processos ao sistema que abrange a cana-de-açúcar, cultura esta tão fundamental na cadeia produtiva do país.

Sabe-se da necessidade e busca pela transformação genética dessa cultura a fim de se obter ganhos na produtividade com plantas uniformes, apresentando qualidade e vigor, bem como serem resistentes. Desta forma a embriogênese somática, a organogênese e a utilização de biorreatores mostram-se como alicerce para este processo, fornecendo toda a base de resultados e protocolos, além de garantirem a manutenção, maximização e, sobretudo a eficiência no que se diz respeito a uma produção em larga escala, em pequenos espaços e de rápidos resultados.

Pesquisas e estudos devem ser cada vez mais fomentados, levando em consideração toda a importância dessas técnicas de micropropagação, resultando em desenvolvimento para o setor sucroenergético e para o país.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, A.; NAZ, S.; SIDDIQUI, F. A.; IQBAL, J. An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Journal of Botanic**, Pakistan, v. 40, n. 1, p. 139-149, 2008.
- ALI, A.; NAZ, S.; SIDDIQUI, F.A.; IQBAL, J. Rapid clonal multiplication os sugarcane (*Saccharum officinarum*) though callogenesis and organogenesis. **Journal of Botanic**, Pakistan, v.40, n. 1, p. 123-138, 2008.
- ALMEIDA, R. O. **Avaliação de sistema de remoção de gene marcador de seleção por recombinação sítio específica em *Passiflora edulis* spp., embriogênese somática e organogênese direta em *Saccharum officinarum* L.** 2011. 88f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; TELLEZ, P.; CHAN, M.T.; YU, S.M.; TRUJILLO, L.E.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, Cuba, v.7, p. 213-222, 1998.
- BARBA, R.; NICKELL, L.G. Nutrition and organ differentiation in tissue culture of sugarcane – a monocotyledon. **Planta**, Honolulu, v. 89, p. 299-302, 1969.
- BEHERA, K. K.; SAHOO, S. Rapid In vitro Micro propagation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) Through Callus Culture. **Nature and Science**, Orissa, v.7, n. 4, 2009.
- BLANCO, M.A., NIEVES, N., SÁNCHEZ, M., BORROTO, C.G., CASTILLO, R., GONZÁLEZ, J.L., ESCALONA, M., BÁEZ, E.; HERNANDEZ, Z. Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 51, p. 153-158, 1997.
- BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal**, Queensland, v.2, p.409-416, 1992.
- BUTTERFIELD, M.K.; IRVINE, J.E.; VALDEZ GARZA, M.; MIRKOV, T.E. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, Weslaco, v.104, p.797-803, 2002.
- CHENGALRAYAN, A. A.; GALLO-MEAGHER, A. In Vitro regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Cainesville, Florida, v. 47, p. 477-482, 2005.
- CHOWDHURY, M.K.U.; VASIL, I.K. Molecular analysis of plants regenerated fromembryogenic cultures of hybrid sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.181-188, 1992.

CRESPO, L. E. C. de; **Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) em ambientes que favorecem condições heterotróficas e mixotróficas: um estudo relacionado à fotossíntese, à eficiência fotoquímica e às relações hídricas**. 2007. 64f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, RJ.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar safra 2013/14, quarto levantamento. Brasília: Conab, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_10_09_00_57_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_13.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2014.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press., 1981. 126p.

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**, Mumbai, v. 87, p.764-768, 2004.

ELDESSOKY, D. S.; ISMAIL, R. M.; HADI-ABDEL, A.; ABDALLAH N. Establishment of regeneration and transformation system of sugarcane cultivar GT54-9 (C9). **GM Crops**, London, v. 2, n.2, p. 126-134, 2014.

FALCO, M.C.; TULMANN NETO, A.T.; UILIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Reports**. New York, v. 19, p.118-1194, 2000.

FERNANDES, A. JA. **Manual da cana-de-açúcar**. 1. ed. Piracicaba: Livrocere, 1984. 196p.

FRANKLIN, G.; ARVINTH, S.; SHEEBA, C.J.; KANCHANA, M.; SUBRAMONIAN, N. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum spp.* Hybrids) midrib segment explants. **Plant Growth Regulation**, Braga, v. 50, p.111-119, 2006.

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

GARCIA, R.; 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**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 181-190, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. Vol. 1. p.83-260.

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, 1998. Vol. 2. p.533-568.

HERCULANO, L.; ARAUJO, M. M. ; CARNEIRO, F. W. O. ; CAMARA, T. J. R. . **Obtenção de Plantas de cana-de-açúcar por meio de embriogênese somática direta.** In: IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão senama nacional de ciências e tecnologia, 2009, Recife. JEPEX 2009. Recife, 2009. v. IX.

KHAN, I.A.; DAHOT, M.U.; SEEMA, N.; BIBI, S.; KHATRI, A. Genetic variability in plantlets derived from callus culture in sugarcane. **Journal of Botany**, Pakistan, v. 40, n. 2, p. 547-564, 2008.

LIMA, M.A.C.; GARCIA, R.O.; MARTINS, G.S.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro e suscetibilidade 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.** São Paulo, v. 24, n. 1, p. 73-77, 2001.

LORENZO, J. C.; GONZÁLES, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in a improved temporary immersion system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 54, p. 197-200, 1998.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MALUTA, F. A.; BORDIGNON, S. R.; ROSSI M. L.; AMBROSANO, G. M. B.; RODRIGUES, M. L. Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 9, p.1303-1307, 2013.

MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V.R.; SUDHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; KASTHURIRENGAN, S. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, India v, 23, n. 3 p.134-143, 2004.

MELO, G. M. de; BARBOSA, M. R.; DIAS, A. L. F. de; WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Pré-condicionamento in vitro de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para tolerância ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, (Suplemento), p.S27–S33, 2014.

MENEZES, T. S. A.; SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F. de; BLANK, A. F. Embriogênese somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista GEINTEC** – ISSN: 2237-0722. São Cristóvão/SE – 2012. Vol .2, n. 1, p. 32-41.

MOLINARI, H. B. C.; **Expressão estresse-induzida do gene p5cs em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico.** 2006. 126f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S. de; SEGATO, S. V.; MATTIUS C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. Termo In: SEGATO, S. V; PINTO, A. S. de; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. de. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. 1. p. 11-18.

MUDRY, C. S. de; **Otimização de protocolos de indução da embriogênese somática em cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

NÓBREGA J. C. M. de; DORNELAS, M. C.; Biotecnologia e melhoramento da cana-de-açúcar. Termo In: SEGATO, S. V; PINTO, A. S. de; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. de. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. 1. p. 40-56.

NOGUEIRA, G. F. **Regeneração, conservação *in vitro* e estabilidade genômica em cana-de-açúcar**. 2013. 196f. Tese (Doutorado Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PAEK, K. Y.; HAHAN, E. J.; SON, S. H. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. **In vitro Cellular Developmental Biology Plant**. v.37, p.149-157, 2001.

PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; HOFFMAN, A. RAMOS, J.D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 130p.

PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; HOFFMAN, A. RAMOS, J.D. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 159p.

PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; HOFFMAN, A. RAMOS, J.D. **Introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 127p.

RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. **Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais**. EMBRAPA – Semi-Árido: Documentos 214, Petrolina, 2008. 26p.

ROCHA, P. S. G. da; OLIVEIRA, R. P. de; SCIVITTARO, W. B. Micropropagação de cana-de-açúcar com diodos emissores de luz e ajuste da concentração de sacarose do meio de cultivo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.7, p.1168-1173, jul, 2013.

SCHEIDT, G. N. **Desenvolvimento e validação de um biorreator do tipo imersão por bolhas para micropropagação de plantas**. 2008. 105f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

SEEMA, N.; OAD, F. C.; KHAN, I. A.; TUNIO S.; YASMIN, M. A. S. S.; KHATRI A. BIBI, S. Influence of phytohormone on the organogenesis of sugarcane. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, p. 1531-1534, 2011.

SEGATO, S. V; MATTIUS C. F. M; MOZAMBANI, A. E.; Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. Termo In: SEGATO, S. V; PINTO, A. S. de; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. de. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. 1. p. 19-36.

SILVA, A. B. **Biorreator e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro**. 2006. 142f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, L. E. ; SILVA, M. M. A. ; WILLADINO, L. G. ; CAMARA, T. J. R. . Indução de embriogênese somática indireta em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009, Recife/PE. **Anais do IX JEPEX**. Recife/PE: UFRPE, 2009.

SILVA, M. M. A. ; HERCULANO, L. ; CARNEIRO, F. W. O. ; WILLADINO, L. ; CAMARA, T. R. . Efeito da luminosidade na formação de embriões somáticos de cana-de-açúcar in vitro. In: VI Semana Nacional de Ciência e Tecnologia; IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2009, Recife. **Anais do IX JEPEX**, 2009.

SMIULLAH; KHAN F. A.; ABDULLAH; IFTIKIHAR R.; RAZA, M. M.; ASLAM R.; HAMMAD, G.; IJAZ, A.; MAQSSOD, R. H.; IJAZ, R. Callogenesis and Organogenesis Studies in Some Accessions of *Saccharum officinarum* L. **Journal of Agricultural Science**, Canada, v. 5, n. 4, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. Eliane Romanato Santarém. 3º ed. Porto Alegre: ed. Artmed, 2004.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of bioreactors used for shoots and embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 39, p.147-15, 1997.

TEIXEIRA, J.B. Biorreator de imersão temporária desenvolvido pela EMBRAPA – Recursos genéticos e biotecnologia. EMBRAPA: Brasília, DF, 2002.

ÚNICA. União da Indústria da Cana-de-açúcar. Sítio eletrônico. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes/pag=5>>. Acesso em: 04 nov. 2014.

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

11. APÊNDICES

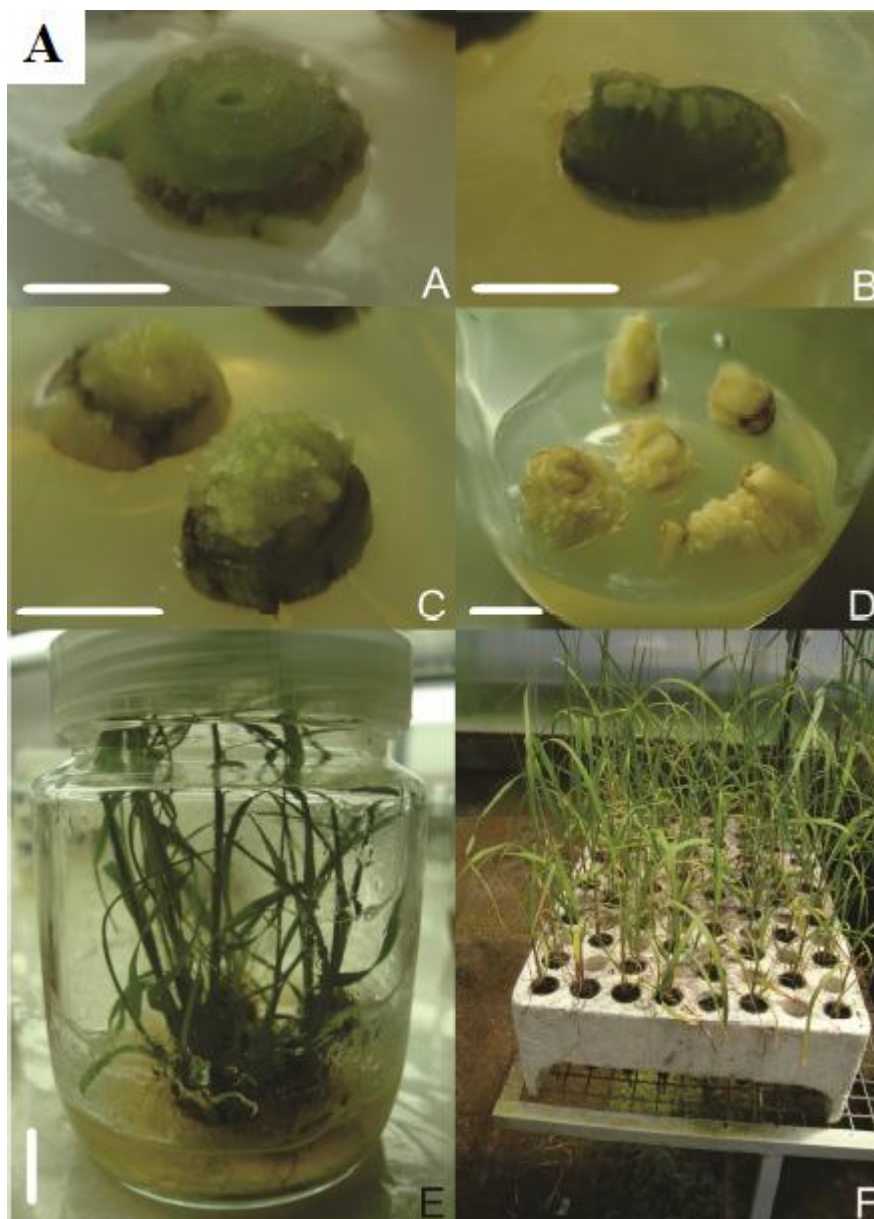


Figura A: Etapas da regeneração da cultivar RB855156. Formação de calos em ambiente iluminado (A), calos de aspecto translúcidos formados em ambiente de pouca luz (B), calos de coloração esbranquiçada formados em ambiente de penumbra (C), calos embriogênicos formados no escuro (D), regeneração de plântulas in vitro (E) e desenvolvimento das plantas em casa de vegetação (D). Barra: 1 cm. Mudry, 2011.

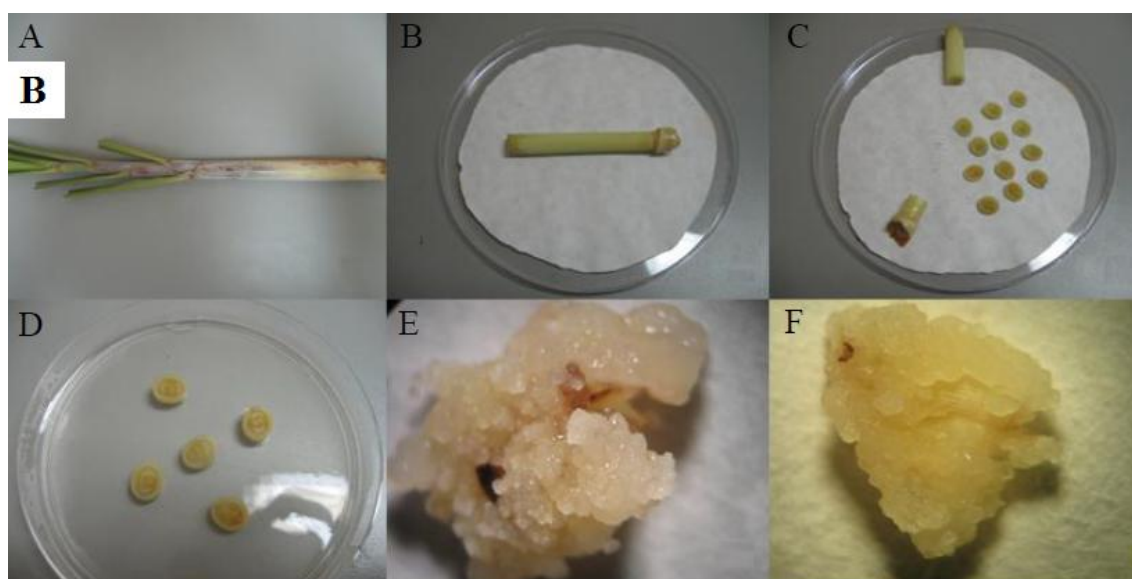


Figura B: Preparação das amostras e formação de calos em cana-de-açúcar. A – ápice da planta sem as folhas velhas; B – folhas jovens (palmitos) após desinfestação; C – explantes de folhas jovens próximos ao meristema apical; D – secções transversais dos explantes em meio de indução; E- calo embriogênico; F –calo não-embriogênico. Almeida, 2011.

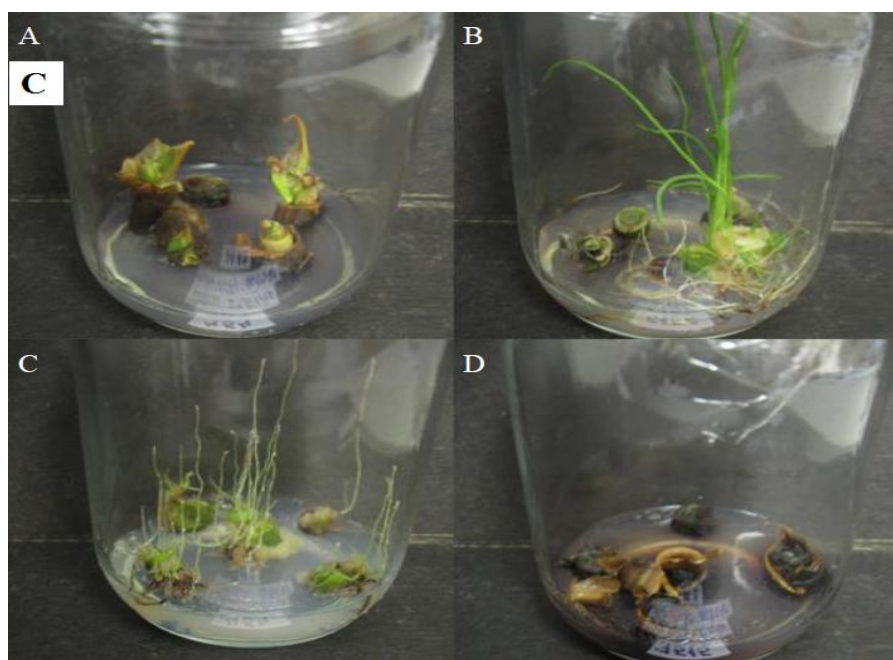


Figura C: Resposta morfogénica de explantes de cana-de-açúcar após 75 dias em meio de indução: A – tratamento controle (M12); B – Desenvolvimento de

organogênese normal (brotos); C – Desenvolvimento de organogênese anormal; D – Explantes oxidados. Almeida, 2011.



Figura D: Biorreator de imersão por bolhas (B.I.B.[®]). Viável e eficaz na produção de mudas e metabólitos secundários, podendo trabalhar com vários estágios. Este sistema permite a renovação do ar no ambiente in vitro, aumentando a produtividade.



Figura E: Biorreator de prateleira, de imersão temporária (RITA[®]), contendo os tubos autoclaváveis, filtros de ar, válvulas elétricas e compressores.