

ELIANE HEERDT

**INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CANA-DE-
AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

H459i
2008

Heerdt, Eliane, 1984-

Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar /
Eliane Heerdt. – Viçosa, MG, 2008.
xiii, 39f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 35-39.

1. Cana-de-açúcar - Genética. 2. Genética vegetal.
3. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22.ed. 633.612

ELIANE HEERDT

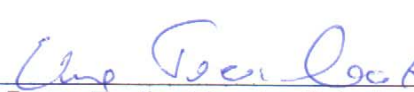
**INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CANA-DE-
AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

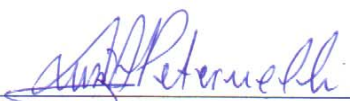
APROVADA: 17 de março de 2008.



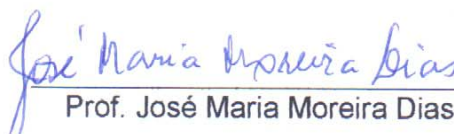
Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Co-Orientador)



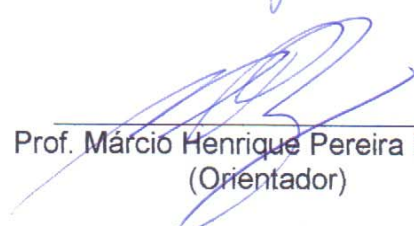
Pesq. Eveline Texeira Caixeta
(Co-Orientadora)



Prof. Luiz Alexandre Peternelli



Prof. José Maria Moreira Dias



Prof. Márcio Henrique Pereira Barbosa
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força em todos os momentos da minha caminhada.

Aos meus pais, Darci Heerdt e Valmira Catarina Pereira Heerdt e ao meu irmão e cunhada, Jeferson Heerdt e Raquel Regina Dallagnol Heerdt, pelo constante apoio, compreensão e pelo imenso carinho dedicado.

Ao meu orientador, Márcio Henrique Pereira Barbosa, pelo apoio, compreensão e paciência.

Aos meus Conselheiros, Eveline Caixeta e Sérgio Yoshimitsu Motoike, por terem acreditado e confiado em mim, pelo apoio nas horas difíceis, pelo incentivo e pelos conhecimentos transmitidos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação.

Ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos que encontrei durante minha breve estadia em Viçosa: Magali, César, Cristina, Lucir, Cândida, Cássia, Flávio, Valdir e Luzia, pelo agradável convívio e momentos de descontração.

A todos os companheiros do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Aos obstáculos enfrentados, que foram como degraus na minha vida e muito me fizeram amadurecer.

Todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para o bom andamento desse trabalho.

BIOGRAFIA

Eliane Heerdt, filha de Darci Heerdt e Valmira Catarina Pereira Heerdt, nasceu em 21 de janeiro de 1984, na cidade de Toledo – PR.

Em 2001 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Paranaense, campus Toledo – PR, graduando-se em dezembro de 2005.

Em fevereiro de 2006, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, concentrando as suas atividades na área de “Embriogênese Somática da Cana-de-Açúcar”, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em março de 2008.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos gerais da cana-de-açúcar.....	3
2.1.1. Importância econômica.....	3
2.1.2. Origem e características de <i>Saccharum spp.</i>	4
2.1.2.1. Espécies selvagens.....	4
2.1.2.2. Cultivares antigas.....	5
2.1.2.3. Cultivares modernas.....	7
2.1.3. Taxonomia.....	8

2.1.4. Complexo <i>Saccharum</i>	8
2.2. Nobilitação.....	9
2.3. Biotecnologia.....	9
2.3.1. Transgenia.....	10
2.3.2. Propagação <i>in vitro</i>	11
2.3.2.1. Embriogênese somática	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material vegetal.....	14
3.2. Indução da embriogênese somática.....	15
3.3. Multiplicação dos calos embriogênicos.....	15
3.4. Maturação e germinação <i>in vitro</i> dos embriões somáticos.....	15
3.5. Aclimatização das plântulas.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Desinfestação.....	17
4.2. Indução da embriogênese somática.....	17
4.3. Multiplicação dos calos embriogênicos.....	20
4.4. Maturação e germinação <i>in vitro</i> dos embriões somáticos.....	28
4.5. Aclimatização das plântulas.....	32
5. CONCLUSÕES.....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXO.....	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Formação de calos na presença da auxina 2,4-D. A. RB835486 sob 6 mg L⁻¹ de 2,4-D; B. RB855536 sob 1 mg L⁻¹ de 2,4-D; C. e D. RB928064 sob 3 e 9 mg L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente.....</p>	18
<p>Figura 2. Expansão dos calos, indicada pelo contorno dos mesmos durante a avaliação. A. RB835486 sob 3 mg L⁻¹ de 2,4-D; B. RB855536 sob 1 mg L⁻¹ de 2,4-D; C. RB928064 sob 1 mg L⁻¹ de 2,4-D.....</p>	21
<p>Figura 3. Expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB835486.....</p>	22
<p>Figura 4. Expansão dos calos da cultivar RB835486 cultivados com 3 mg L⁻¹ de 2,4-D. A. Placa de petri com oito aglomerados de calos; B. Detalhe de um aglomerado de calos.....</p>	22
<p>Figura 5. Multiplicação dos calos RB835486 em meio de cultura contendo com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D.....</p>	23
<p>Figura 6. Multiplicação dos calos RB835486 em meio de cultura contendo com 6 mg L⁻¹ de 2,4-D.....</p>	23
<p>Figura 7. Multiplicação dos calos da cultivar RB855536 em meio de cultura contendo com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D.....</p>	24

Figura 8. Expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB855536.....	24
Figura 9. Multiplicação dos calos da cultivar RB855536 em meio de cultura contendo com 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D.....	25
Figura 10. Multiplicação dos calos da cultivar RB855536 em meio de cultura contendo com 6 mg L ⁻¹ de 2,4-D.....	25
Figura 11. Expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB928064.....	27
Figura 12. Multiplicação dos calos da cultivar RB928064 em meio de cultura contendo com 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D.....	27
Figura 13. Multiplicação dos calos da cultivar RB928064 em meio de cultura contendo com 3 mg L ⁻¹ de 2,4-D.....	28
Figura 14. Multiplicação dos calos da cultivar RB928064 em meio de cultura contendo com 6 mg L ⁻¹ de 2,4-D.....	28
Figura 15. Germinação dos embriões somáticos sob os diferentes tratamentos: A. Escuro + 0 g L ⁻¹ de sacarose; B. Escuro + 60 g L ⁻¹ de sacarose; C. Claro + 0 g L ⁻¹ de sacarose; D. Claro + 60 g L ⁻¹ de sacarose.....	29
Figura 16. Aclimatização das plantas formadas, sob os diferentes tratamentos: A. Claro + 0 g L ⁻¹ de sacarose; B. Claro + 60 g L ⁻¹ de sacarose; C. Escuro + 0 g L ⁻¹ de sacarose; D. Escuro + 60 g L ⁻¹ de sacarose.....	33

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Número de calos formados na presença e ausência do regulador de crescimento 2,4-D para todas as cultivares avaliadas.....	18
Tabela 2. Número de calos formados na presença dos diferentes níveis de 2,4-D para as três cultivares avaliadas.....	19
Tabela 3. Número de calos formados na presença de 2,4-D para as três cultivares em análise.....	20
Tabela 4. Análise de variância entre variedade, hormônio e a interação entre variedade e hormônio.....	21
Tabela 5. Expansão em mm dos calos embriogênicos de cada tratamento do regulador de crescimento 2,4-D para cada cultivar.....	26
Tabela 6. Número de plântulas que desenvolveram (D.) e que não desenvolveram (N. D.) da cultivar RB928064 e, seus respectivos X^2 calculados para os diferentes tratamentos.....	30

Tabela 7. Número de plântulas que desenvolveram (D.) e que não desenvolveram (N. D.) da cultivar RB835486 e, seus respectivos X^2 calculados para os diferentes tratamentos.....	30
Tabela 8. Número de plântulas que desenvolveram (D.) e que não desenvolveram (N. D.) da cultivar RB855536 e, seus respectivos X^2 calculados para os diferentes tratamentos.....	31
Tabela 9. Número de plantas que sobreviveram ou não ao processo de aclimatização, a partir do total de plântulas formadas em cada tratamento e para cada cultivar.....	32
Tabela 10. Resumo da análise de regressão ⁺ para expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB835486.....	40
Tabela 11. Resumo da análise de regressão ⁺ para expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB855536.....	40
Tabela 12. Resumo da análise de regressão ⁺ para expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB928064.....	40

RESUMO

Heerdt, Eliane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2008.
Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar.
Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Co-Orientadores:
Sérgio Yoshimitsu Motoike e Eveline Texeira Caixeta.

A cana-de-açúcar é uma das espécies mais cultivadas em todo o mundo, abrangendo mais de 80 países. Com os avanços biotecnológicos surgem importantes ferramentas para o melhoramento genético desta espécie. Dentre as principais técnicas, está a transgenia que é de suma importância para espécies de propagação clonal como a cana-de-açúcar. Ressalta-se que a transgenia é dependente do cultivo *in vitro* que por sua vez apresenta como possibilidade a embriogênese somática, objeto do presente estudo. Para a indução da embriogênese, avaliaram-se os efeitos do regulador de crescimento 2,4-D nas concentrações de 0, 1, 3, 6 e 9 mg L⁻¹. Durante a multiplicação, testou-se 1, 3 e 6 mg L⁻¹ de 2,4-D. Na maturação e germinação, foram avaliadas a presença e ausência de luz (irradiância), além da presença ou ausência de sacarose no meio de cultura. A auxina é fundamental para a indução de calos embriogênicos, contudo não houve diferença significativa nas concentrações utilizadas do regulador de crescimento. Durante a fase de multiplicação, observou-se que a interação entre o 2,4-D e as cultivares foi

significativa. Logo, procedeu-se o desdobramento da análise, onde 3 mg L^{-1} de 2,4-D foi o tratamento mais eficiente para a multiplicação de calos da cultivar RB835486. Nas cultivares RB855536 e RB928064 houve uma relação inversa entre a concentração do regulador de crescimento e a expansão dos calos em milímetros. A presença ou ausência de sacarose no meio de cultura não influenciou significativamente a germinação dos embriões somáticos. O mesmo foi observado nos calos que foram mantidos sob o fotoperíodo de 16 horas-luz (claro) ou no escuro durante os 30 dias de cultivo. Apesar do limitado número de plântulas formadas, o processo de aclimação das mesmas foi feito com sucesso, alcançando 59% de sobrevivência.

ABSTRACT

Heerdt, Eliane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march 2008.
Induction of somatic embryogenesis in sugarcane. Adviser: Márcio Henrique Pereira Barbosa. Co-Advisers: Sérgio Yoshimitsu Motoike and Eveline Teixeira Caixeta.

Sugarcane is one of species more cultivated in whole world, reaching more than 80 countries. With the biotechnological progresses, important tools appear for genetic breeding of cane. The production of transgenic plants is very important for clonal propagation species as sugarcane. But plant transformation is dependent of *in vitro* cultivation and, among their techniques it is somatic embryogenesis, the object of present study. For embryogenesis induction were evaluated effects of growth regulator 2,4-D in followed concentrations: 0, 1, 3, 6 and 9 mg.L⁻¹. During multiplication was tested 1, 3 and 6 mg.L⁻¹ of 2,4-D. In maturation and germination of callus were evaluated presence and absence of light, and the presence or sucrose absence in the medium of cultivation. It was verified that the conditions of the plant in field affect the surface sterilization process directly. The auxin is very important for embryogenic callus induction, however there wasn't significant difference among different concentrations of growth regulator. During the multiplication it was observed that the interaction among 2,4-D and the genotype was significant. Therefore, it was made the

unfolding of analysis. The 3 mg.L⁻¹ of 2,4-D treatment was the most efficient for callus multiplication of clone RB835486. In the clones RB855536 and RB928064 the multiplication of embryogenic callus was inversely proportional to the concentration of 2,4-D in the medium. The presence or sucrose absence in the culture medium didn't influence the germination of the somatic embryos significantly. The same was observed in the callus that were maintained under light (clear) or in the darkness during the 30 days of cultivation. In spite of the limited number of regenerate plantlets, the process of plantlets acclimatization was made with success, because 59% of survivors were obtained.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) encontra-se entre os cultivos de maior extensão na escala mundial por sua grande importância econômica. Esta cultura não é utilizada apenas para a produção de açúcar aproveitando o seu elevado teor de sacarose, mas também é útil na produção de álcool, papel, alimentação, dentre outras atribuições. É cultivada em regiões tropicais e subtropicais de mais de 80 países, sendo o Brasil o maior produtor mundial de açúcar (Conab, 2007). O setor sucroalcooleiro responde ao faturamento anual da ordem de US\$ 7 bilhões (Unica, 2007). Atualmente, as variedades de cana cultivadas são o resultado do cruzamento interespecífico entre *Saccharum officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*.

Em decorrência da posição de destaque que ocupa na economia mundial, a cultura da cana está freqüentemente inserida em programas de melhoramento, visando à introdução de características de interesse agrônomo, como resistência a pragas e patógenos, tolerância a herbicidas e aumento no teor de sacarose.

Em programas de melhoramento da cana-de-açúcar, a transformação genética é uma importante ferramenta para a obtenção de variedades agronomicamente superiores. Para a transformação genética, é essencial o desenvolvimento de protocolos eficientes com vistas à obtenção de plantas, sendo uma de suas opções as técnicas de cultivo *in vitro* (Desai et. al, 2004).

Um dos caminhos do cultivo *in vitro* é a embriogênese somática, que envolve a formação de embriões a partir de tecidos somáticos (Raemakers et. al, 1995) e, muitas vezes, segundo Litz e Gray (1995), a partir de células únicas, evitando a ocorrência de quimeras. Portanto, a embriogênese somática é uma via mais eficiente para a obtenção de plantas transformadas, do que a organogênese (Ho e Vasil, 1983). Além disso, em muitas plantas onde se obteve embriogênese somática, observou-se a ocorrência de embriogênese secundária, fenômeno em que novos embriões surgem a partir dos embriões somáticos originais (Raemarkers et al., 1995). A embriogênese somática secundária tem amplas aplicações na biotecnologia, como a propagação em

massa de novas plantas, criopreservação, transformação genética e indução de mutação (Litz e Gray, 1995; Raemarkers et al., 1995).

Os protocolos já descritos para a propagação *in vitro* de cana-de-açúcar têm como base processos de organogênese e embriogênese somática (Taylor e Dukic, 1993; Falco et al., 1996). Ambos podem ser induzidos direta ou indiretamente, sendo que no segundo caso, a formação de órgãos ou embriões se dá a partir da formação de calos. Em cana-de-açúcar, a obtenção de calo, geralmente, se dá cultivando-se segmentos de folhas imaturas de plantas do campo, em meios de cultura contendo auxinas, tais como 2,4-D (Gallo-Meagher et al., 2000) ou picloran (Fitch e Moore, 1990). Embora a morfogênese possa ocorrer em meios desprovidos de reguladores de crescimento e na presença de luz (Taylor et al., 1992; Falco et al., 1996), a eficiência do referido processo pode ser potencializada por diferentes fitorreguladores (Chengalrayan e Gallo-Meagher, 2001). Entretanto, como a resposta morfogênica é fortemente influenciada pelo genótipo, é fundamental que seja realizada adaptação dos protocolos em cada cultivar a ser utilizada (Preece, 1995).

Como mencionado anteriormente, a transformação genética é ferramenta importante para os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar e que, para tal, se faz necessário a otimização de protocolos eficientes para obtenção massal de plântulas. Assim, o presente estudo tem por objetivo a obtenção de embriogênese somática em três cultivares RB de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da cana-de-açúcar

2.1.1 Importância econômica

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é a mais antiga monocultura explorada pelo Brasil. Relata-se que esta planta foi introduzida nas Américas na primeira metade do século XVI.

Em 1995, a área mundial cultivada foi de 18 milhões de hectares. Sua produção vem crescendo em função do aumento do seu consumo como fonte de energia (eletricidade e etanol) e açúcar (Almeida, 2003; Koblitz Energias Renováveis, 2007; São Paulo Ethanol Summit, 2007).

A cana-de-açúcar ocupa lugar de destaque na agricultura devido sua importância econômica, sendo uma das espécies vegetais mais cultivadas no mundo, alcançando mais de 80 países (Ho e Vasil, 1983).

Estima-se para o Brasil uma produção de mais de 470 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por hectare na safra 2007/08, o que corresponde a 25% da produção total mundial, colocando nosso país como o maior produtor de cana-de-açúcar e maior exportador de açúcar do mundo (10 milhões de toneladas) (Conab, 2007). Tudo isso é reflexo da importância do país como o primeiro a introduzir a produção, em larga escala, de um combustível alternativo ao petróleo (Teixeira, 2006).

Apesar da posição de destaque, o rendimento médio da cultura no país é considerado baixo, com os melhores índices nas regiões centro-sul e nordeste. Os maiores produtores são os Estados de São Paulo, Alagoas e Paraná, totalizando mais de 345 milhões de toneladas na safra 2007/08 (Conab, 2007).

Devido à grande importância da cultura da cana-de-açúcar na economia mundial, a FAPESP, pela rede ONSA (Organização para Seqüenciamento e Análise de Nucleotídeos), financiou o programa SUCEST de seqüenciamento de genes expressos da cultura. Tal programa gerou seqüências ESTs com grande valor científico agregado, definindo o emprego de diversos tipos de bibliotecas originadas de estádios fisiológicos diversos (Sucest-Fun Project, 2007).

O seqüenciamento do genoma da cana-de-açúcar tem facilitado e acelerado a identificação de genes responsáveis por caracteres desejáveis, possibilitando a manipulação subsequente de genes de interesse através de técnicas de genética molecular. Os avanços gerados pelo SUCEST, somados à complexidade do genoma da cana-de-açúcar tornam esta espécie uma excelente candidata ao melhoramento por meio da engenharia genética (Kossmann et. al, 2007).

2.1.2 Origem e características das espécies *Saccharum spp.*

O centro de origem da cana-de-açúcar, tal como sua história, é controvertido entre diversos autores (Grivet et. al., 2004; Lebot, 1999). Contudo, acredita-se que a cana estabeleceu-se primeiramente na Melanésia, Indonésia a Nova Guiné (6000 anos a. C.), disseminando-se para o Pacífico Sul, Índia, China e países vizinhos, por volta de 1500 – 1000 anos a. C. Posteriormente, a cana-de-açúcar migrou para várias partes do mundo, especialmente países tropicais e subtropicais (Teixeira, 2006).

O melhoramento da cana-de-açúcar teve início juntamente com seu cultivo, sendo ela uma das espécies submetida mais intensamente ao melhoramento genético, comparando-se apenas ao milho (Matsuoka et. al., 1999). Nas Américas, a cana-de-açúcar foi introduzida por Martim Afonso de Souza na primeira metade do século XVI, tornando-se a monocultura mais antiga explorada no Brasil (Pedrozo, 2006; ProCana, 2007).

Seis espécies são descritas para o gênero *Saccharum* (Amalraj e Balasundaram, 2006). As espécies e cultivares do complexo *Saccharum* podem ser classificadas em espécies selvagens, e dentre as espécies cultivadas, em cultivares antigas (tradicionalis) e cultivares modernas (Grivet et al., 2004). Dentre as cultivares antigas, encontram-se algumas espécies cultivadas. As cultivares modernas são constituídas, em sua maioria, de híbridos interespecíficos.

2.1.2.1 Espécies selvagens

***Saccharum spontaneum* L. (2n = 40 – 128)**

A principal espécie dentre as selvagens é caracterizada por apresentar morfologia variada e ampla capacidade de adaptação ambiental (Grivet et al.,

2004). Há evidências de que a Índia seja seu centro de origem e diversidade, sendo, posteriormente, transportada para outras partes da Ásia. Sua distribuição abrange a faixa tropical dos continentes Africano, Asiático e Oceania (Jannoo et al., 1999). O possível envolvimento dos gêneros *Esclerostachya* e *Erianthus* sect. *Ripidium* Henrard na origem de *S. spontaneum* foi sugerido inicialmente. Entretanto, essa espécie é provavelmente produto da introgressão entre membros ou protótipos do complexo *Saccharum* (Amalraj e Balasundaram, 2006). Apesar do seu baixo teor de açúcar, tem contribuído para o melhoramento através da transmissão de caracteres como vigor, dureza, perfilhamento e capacidade de rebrota da soqueira, especialmente devido ao rizoma vigoroso e à resistência a estresses bióticos e abióticos. Essa espécie possui importante participação no genoma de novas cultivares (Grivet et al., 2004).

***Saccharum robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl (2n = 60 – 205)**

Esta espécie apresenta colmos vigorosos, bastante fibrosos e, geralmente, muito pobres em açúcar (Grivet et al., 2004). Em seu habitat hibridiza-se facilmente com espécies e gêneros relacionados, produzindo grandes populações segregantes. Apesar de programas de melhoramento de vários países utilizarem *S. robustum* com o objetivo de aumentar a produtividade e a quantidade de fibra em cultivares de cana, o uso desta espécie no desenvolvimento de cultivares comerciais é limitado a poucas cultivares havaianas (Schenck et al., 2004). Supõe-se que esta espécie tenha se originado da introgressão de *S. spontaneum* com outros gêneros, mas ainda há dúvidas, quanto a sua origem (Pedrozo, 2006).

2.1.2.2 Cultivares antigas

As cultivares tradicionais quase desapareceram do cultivo comercial, contudo, permanecem como importantes progenitores de cultivares modernas e como potencial fonte de caracteres para introduções futuras. Historicamente, elas descendem em uma linha direta das primeiras cultivares domesticadas. Podemos considerar três espécies:

***Saccharum officinarum* L (2n = 80)**

Conhecida como “cana nobre” por sua cor viva, colmos grossos e suculentos, alto teor de sacarose e baixo teor de fibra, características apreciadas na industrialização, além de boa palha natural e alta produção em condições favoráveis de cultivo. Os clones desta espécie são pouco utilizados na agricultura atual, mas podem ser encontrados em cultivo nas regiões da Melanésia (Grivet et al., 2004). Acredita-se que ela tenha dado origem às principais variedades comerciais utilizadas na produção de açúcar, antes da existência de programas de melhoramento. Embora o centro de origem desta espécie não seja relatado com precisão, Nova Guiné é tida como seu centro de diversidade. Admite-se que ela tenha surgido nessa mesma região, tendo como genitores *S. spontaneum*, *Miscanthus* e *Erianthus*, incluindo também *S. robustum* (Nair et al., 2006; Teixeira, 2006). Brandes (1956) e Grassl (1964), ambos autores citados por Teixeira (2006), levantaram a hipótese de que a pressão seletiva pelo manejo humano sobre *S. robustum* originou *S. officinarum* na mesma região do centro de diversidade da cana-de-açúcar. Grivet et al. (2001) reuniram evidências moleculares para a confirmação da hipótese de que *S. officinarum* descende da espécie selvagem *S. robustum*. Há relatos de que esta espécie foi mais cultivada a nível mundial desde o final do século XVIII, até o início do século XIX, além de ser uma das principais espécies contribuintes para o desenvolvimento das cultivares modernas (Matsuoka et al., 1999).

***Saccharum sinense* Roxb. (2n = 111 – 120) e *Saccharum barberi* Jeswiet (2n = 81 – 124)**

São espécies que possuem quantidade de sacarose aceitável para o consumo humano e para extração industrial. Os clones destes grupos distinguem-se daqueles de *S. officinarum* pelos caracteres florais, colmos finos e medianos, concentração baixa a moderada de açúcar, alto teor de fibras, grande resistência a estresses bióticos e abióticos (Pedrozo, 2006).

São cultivadas desde os tempos pré-históricos, na China (*S. sinense*) e no norte da Índia (*S. barberi*). Muitas hipóteses sobre a origem das canas norte indianas e chinesas têm sido sugeridas. As principais são: i) *S. barberi* e *S. sinense* provêm do cruzamento de *S. officinarum* com *S. spontaneum* na Índia

e China, respectivamente, em épocas pré-históricas; ii) *S. barberi* foi desenvolvida de *S. spontaneum* na Índia; iii) *S. barberi* e *S. sinense* são oriundas do cruzamento entre *S. officinarum*, *S. spontaneum* e/ou outros gêneros como *Erianthus* e *Miscanthus* (D'Hont, 2002).

***Saccharum edule* Hassk. (2n = 60 – 80)**

Espécie de menor interesse dos fitomelhoristas. Caracteriza-se por ter inflorescência compactada e comestível, sendo consumida como hortaliça pelos nativos da Melanésia, porém seu cultivo é reduzido. É considerada resultante do cruzamento de *S. officinarum* ou *S. robustum* com outros gêneros, e se assemelha bastante a essa última espécie (Roach e Daniels, 1987, citados por Pedrozo, 2006).

2.1.2.3 Cultivares atualmente em cultivo

As variedades cultivadas atualmente são híbridos inter e intra-específicos sintetizados a partir das espécies *S. officinarum* (cana-nobre), *S. barberi* (cana indiana), *S. sinense* (cana chinesa), *S. spontaneum* e *S. robustum* (espécies selvagens).

As cultivares modernas foram substituindo as cultivares tradicionais durante o século XX, sendo que no começo deste século, hibridações de *S. spontaneum* com *S. officinarum*, desde a Índia até Java, resultaram no melhoramento do vigor da cana-de-açúcar. A partir de então, com a divulgação de resultados tão promissores, essa metodologia passou a ser praticada para a obtenção das canas cultivadas. Com o intuito de se obter melhores caracteres para esses híbridos interespecíficos, os cruzamentos foram tornando-se mais complexos, surgindo o processo conhecido como “nobilização”. Esse processo consiste no intercruzamento entre cultivares tradicionais e a espécie selvagem *S. spontaneum*, seguido por vários retrocruzamentos com *S. officinarum*.

Atualmente, a base genética obtida dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar do início do século passado ainda é utilizada com sucesso pelos melhoristas, através de cruzamentos interespecíficos e retrocruzamentos com o parental nobre *S. officinarum*. Duas linhas de pesquisa são seguidas: i) hibridações com gêneros similares (*Miscanthus sp.*, *Erianthus sp.*, *Narenga sp.*

e *Sorghum sp.*) e ii) regresso a provável área de origem do gênero *Saccharum spp.*, com o objetivo de coletar germoplasma.

2.1.3 Taxonomia

A cana-de-açúcar é uma planta herbácea, alógama, semi-perene e pertencente à tribo Panicoideae, subtribo Andropogonae, família Graminae (Poaceae) e gênero *Saccharum*.

Devido à existência de relações filogenéticas variadas e com base em critérios de morfologia, taxonomistas e evolucionistas têm enfrentado grandes dificuldades para limitar as espécies do gênero *Saccharum* (Irvine, 1999). De forma geral, os melhoristas adotaram a classificação proposta por Jeswiet (1925) e modificada por Brandes (1965), ambos autores citados por Teixeira (2006), onde são reconhecidas seis espécies para o gênero: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule*. Alguns taxonomistas consideram *S. barberi* e *S. sinense* como uma só espécie.

A partir de dados geobotânicos, foi observado que os gêneros *Saccharum*, *Erianthus*, *Sclerostachya* e *Narenga* formam um grupo de intercruzamento muito próximo, provavelmente envolvido na origem da cana-de-açúcar. Posteriormente, este grupo foi expandido, incluindo o gênero *Miscanthus*. As espécies destes gêneros formam o chamado “Complexo *Saccharum*”.

2.1.4 Complexo *Saccharum*

Os gêneros *Erianthus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya* e *Narenga* estão distribuídos do Himalaia até a Melanésia, estendendo-se para as Ilhas do Pacífico e Sibéria. Geralmente, não contém açúcar e a morfologia do caule pode variar dependendo da espécie.

Estudos moleculares têm analisado as relações entre as espécies dos gêneros pertencentes ao complexo *Saccharum* e seu suposto envolvimento com a origem da cana-de-açúcar. Com base na genética e em seqüências genômicas, estes gêneros apresentam padrões altamente contrastantes (D’Hont et al., 1995). Assim, o acúmulo de dados obtidos por biologia molecular nos últimos dez anos, permitiu a formulação da hipótese de surgimento do gênero *Saccharum* como um grupo definido, independente dos gêneros

Erianthus e *Miscanthus*, sugerindo que o conceito de “Complexo *Saccharum*” (Mukherjee, 1957) é uma superestimativa da contribuição de outros gêneros para o surgimento das canas cultivadas (Grivet et al., 2001)

2.2 Nobilização

No processo de nobilização, ocorrem cruzamentos interespecíficos seguidos de retrocruzamentos com a espécie *S. officinarum*, cana nobre. O que se chama de 1ª nobilização corresponde aos híbridos F₁, resultando do cruzamento entre *S. officinarum* com outra espécie do gênero *Saccharum*. As canas da 2ª nobilização são o resultado do primeiro retrocruzamento (RC₁) entre os híbridos F₁ com *S. officinarum*, e as canas da 3ª e 4ª nobilização, são o resultado do segundo (RC₂) e terceiro (RC₃) retrocruzamentos com *S. officinarum*.

Nos cruzamentos interespecíficos de *S. officinarum* com *S. spontaneum* ocorre uma irregularidade citológica na transmissão do gameta 2n, quando *S. officinarum* participa como genitor feminino. Em estudos citológicos, observou-se na 1ª e 2ª nobilização a ocorrência de um aumento no número de cromossomos nos híbridos, ao invés do número gamético normal. Somente a partir da 3ª nobilização esse aumento não ocorria, transmitindo n = 40, conforme o esperado. Esse processo ocasionou um aumento no número de cromossomos entre os produtos das nobilizações e levou a rápida redução do número relativo aos cromossomos de *S. spontaneum*. Estima-se que *S. spontaneum* tenha apenas uma participação de 10 % no genoma das cultivares modernas.

Com o objetivo de explicar esse acontecimento, Prince (1957) e Bremer (1961), citados por Teixeira (2006), elaboraram três hipóteses: i) Duplicação cromossômica através da endoduplicação durante a meiose; ii) Duplicação cromossômica depois da primeira divisão meiótica; iii) Fusão pós-meiótica de dois núcleos do estágio de tétrade.

2.3 Biotecnologia

A evolução do conhecimento científico, nos anos 60 e 70 permitiu a manipulação de organismos em nível celular e molecular. Com isso, surgiram tecnologias que utilizam células e moléculas biológicas para solucionar

problemas de produção de produtos úteis. O conhecimento científico gerado, somado aos instrumentos biotecnológicos, como, a cultura de células e tecidos, engenharia genética, tecnologia de biossensores, bioprocessamento, tecnologia de anticorpos, engenharia de proteínas, entre outros, geram melhorias na agricultura, no meio ambiente e na medicina.

2.3.1 Transgenia

Utilizando as técnicas de cultura de células e tecidos vegetais e da engenharia genética, ampliaram-se, consideravelmente, as possibilidades de introdução de genes de interesse agrônomo. A introdução de genes exógenos em plantas pode ser feita através da *Agrobacterium tumefaciens* ou por métodos diretos como a eletroporação, microinjeção e a biobalística (Litz e Gray, 1995).

As primeiras canas transformadas relatadas foram obtidas através de biobalística. As plantas foram transformadas com o gene *neo* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II, que confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos, como a geneticina e a canamicina, e *uid -A* que codifica a β -glucuronidase, servindo como gene repórter, permitindo, assim, a visualização do sucesso da transformação (Bower e Birch, 1992, citado por Ulian, 2007).

Chowdhury e Vasil (1992), citado por Riva, et. al (1998) bombardearam calos da variedade híbrida com o gene *bar*, e constataram não haver formação de plantas, em virtude da idade avançada dos calos utilizados.

A otimização das condições de bombardeamento tem demonstrado alta eficiência de co-transformação em cana-de-açúcar, transferindo dois genes. O bombardeamento é um sistema bastante eficiente para inserção de genes de variedades de cana-de-açúcar e isso pode gerar uma maior competitividade no mercado (Ulian, 2007).

A transformação da cana-de-açúcar por bombardeamento está sendo amplamente estudada e, atualmente, existem plantas transgênicas para os mais variados caracteres. Entretanto, os métodos apresentam problemas quanto à complexidade de integração do transgene, pois um grande número de cópias do gene pode ser inserido em regiões nas quais não ocorre transcrição ativa. Assim, pesquisadores têm estudado a aplicação da transformação da cana-de-açúcar mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, técnica que promove

a inserção de poucas cópias em sítios altamente expressos do genoma (Lima et. al, 2001; Riva et. al, 1998).

Assim, verifica-se a grande importância da propagação *in vitro* para a obtenção de plantas, a partir de materiais geneticamente transformados, independentemente do método utilizado para a transformação (Desai et al., 2004).

2.3.2 Propagação *in vitro*

Esta técnica compreende o cultivo asséptico de partes das plantas em condições controladas de nutrição, umidade, luz e temperatura e constitui a aplicação mais direta da cultura de células e tecidos vegetais (Grattapaglia e Machado, 1990; Pereira et al., 2003; Rodrigues, 2005). Ela pode ser alcançada por meio de proliferação de gemas axilares, iniciação de gemas adventícias (organogênese) ou embriogênese somática (Lima et. al, 2001).

Entre as principais vantagens da propagação *in vitro* estão a rapidez em relação a outros métodos de propagação vegetativa, a produção de mudas livres de vírus e outros patógenos, além da possibilidade de sua utilização quando a propagação por técnicas convencionais for muito difícil ou impossível de ser realizada (Ho e Vasil, 1983; Lee, 1988; Litz e Gray, 1995). Em adição, técnicas de transformação genética são dependentes do cultivo *in vitro* para obtenção e multiplicação dos novos genótipos (Litz e Gray, 1995).

2.3.2.1 Embriogênese somática

A embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual células diplóides ou somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de seqüência ordenada de estágios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas (Litz e Gray, 1995). Durante o seu desenvolvimento, embriões somáticos passam por estágios similares àqueles observados na embriogênese zigótica, caracterizando-se como estrutura bipolar sem nenhuma conexão vascular com o tecido materno (Ho e Vasil, 1983; Raemakers et. al, 1995).

A embriogênese somática se dá tanto pela via natural, como pela via artificial, ou induzida *in vitro*. No primeiro caso, células somáticas podem ser direcionadas para esta rota de desenvolvimento, como acontece com o sistema

da embriogenia adventícia a partir do tecido nucelar em *Citrus* spp. e em coníferas, onde os embriões são geneticamente idênticos à planta-mãe, tendo como consequência a perpetuação de populações clonais por meio de semente (Litz e Gray, 1995).

Pela via artificial ou induzida *in vitro*, células somáticas de diferentes estágios de diferenciação podem ser induzidas por estímulos ambientais ou químicos e, se reprogramadas, adquirem novas competências morfogênicas (Fitch e Moore, 1990; Litz e Gray, 1995). O método mais usual para indução da competência embriogênica consiste na exposição de explantes a concentrações adequadas de auxinas durante períodos variáveis de tempo (Ho e Vasil, 1983).

Formas direta ou indireta podem ocorrer no processo de embriogênese somática. Na forma direta, os embriões somáticos formam-se diretamente sobre a superfície dos explantes. Enquanto que na embriogênese indireta, calos embriogênicos são induzidos e na sua superfície são formados os embriões somáticos (Sweby et. al, 1994). A embriogênese somática indireta é o método mais comumente utilizado para obtenção de embriões somáticos para usos práticos e tem sido descrita para numerosas e distintas espécies, como a cana-de-açúcar (Raemakers et. al; 1995).

Material genético, tipo de explante, condições de cultivo como a luz (radiância, qualidade e fotoperíodo), concentração do meio basal (sacarose, nível de nitrogênio e composição), elementos minerais, agentes geleificantes, reguladores de crescimento e pH do meio de cultura são importantes fatores que afetam o processo da embriogênese somática (Preece, 1995).

O fator genético é de extrema relevância, uma vez que diferentes genótipos podem apresentar requerimentos distintos de cultivo para a indução de estruturas embriogênicas (Preece, 1995). Além do material genético, é importante definir a fonte de explante a ser utilizada e a época da coleta, uma vez que vários tecidos da mesma planta ou tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento podem resultar em diferentes respostas, quanto à indução da embriogênese (Ho e Vasil, 1983; Litz e Gray, 1995).

Os tecidos utilizados como fonte de explantes para obtenção de embriões somáticos são de origem variada. Contudo, os tecidos derivados de

embriões imaturos parecem apresentar melhores respostas à indução da embriogênese para cana-de-açúcar (Ho e Vasil, 1983).

Esforços para induzir embriogênese somática têm sido descritos para muitas espécies de interesse econômico (Falco et. *al*, 1996). As metodologias utilizadas envolvem mudanças no meio de cultura, estabelecimento de diferentes tipos ou concentrações de reguladores de crescimento, bem como controle do ambiente da sala de cultivo e da densidade de células (Preece, 1995). A característica notável da embriogênese somática é que simples manipulações podem desencadear séries de eventos que levam à formação do embrião.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais (LCCTV) do setor de Fruticultura do departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

3.1 Material vegetal

Foram utilizados meristemas apicais de cana-de-açúcar de aproximadamente 10 meses de idade, provenientes de plantaço já estabelecida no setor de Fitotecnia, pertencentes a três variedades: RB855536, RB928064 e RB835486.

O palmito do colmo, com 2 cm de largura por 10 cm de altura, foi mantido na água até o início da desinfestação. Esses foram desinfestados com: hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 10 min e solução fungicida na concentração de 1,4 g L⁻¹ por 10 min. Os palmitos, contendo os meristemas apicais, foram levados à câmara de fluxo laminar onde se prosseguiu a desinfestação por 1 min em etanol 70% (v/v), 20 min em solução de bicloreto de mercúrio, seguido por 15 min em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v). Entre cada etapa, esses palmitos foram enxaguados em água estéril por três vezes. Os meristemas apicais foram extraídos e cultivados em tubos de ensaio em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) conforme protocolo de indução da embriogênese.

Dentro de cada etapa do experimento, os materiais contaminados foram descartados e as etapas subseqüentes foram conduzidas apenas com os explantes livres de contaminação.

3.2 Indução da embriogênese somática

Neste experimento, foram testados cinco níveis de 2,4-D, sendo: 0; 1,0; 3,0; 6,0 e 9,0 mg L⁻¹, em delineamento inteiramente casualizado, com diferentes repetições. A unidade experimental foi constituída de um tubo de ensaio contendo um explante, em meio de cultura. Este teve o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da esterilização à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados tubos de ensaio de dimensões de 25 x 150 mm, contendo 10 mL de meio MS adicionado com as diferentes concentrações de 2,4-D, acima mencionadas. Os explantes foram incubados em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro durante 30 dias.

Nesta etapa do experimento, avaliou-se a formação e as características dos calos, com vista ao processo embriogênico.

3.3 Multiplicação dos calos embriogênicos

Para a multiplicação dos calos embriogênicos obtidos, foram testados os tratamentos com 1, 3 e 6 mg L⁻¹ do mesmo fitorregulador (2,4-D).

Os três níveis de 2,4-D foram testados em um delineamento inteiramente casualizado, com diferentes repetições. A unidade experimental foi constituída de um explante, onde, cada explante consistiu de um aglomerado de calos de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, em meio MS (Murashige e Skoog, 1962). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da esterilização à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizadas placas de petri de dimensões de 90 x 150 mm, contendo 30 mL de meio de cultura. Os explantes foram incubados em sala de cultivo com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro durante aproximadamente 20 dias.

Nesta etapa, avaliou-se a expansão em milímetros e aspectos morfológicos dos calos para cada cultivar.

3.4 Maturação e germinação *in vitro* dos embriões somáticos

Nesta etapa foram testados os efeitos da luz (irradiância de 0 e 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidas por tubos fluorescentes, luz do dia com 40 W de potência) e da sacarose como fonte de carbono (0 e 60 g L⁻¹), adicionada ao meio MS.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com diferentes repetições. A unidade experimental foi constituída de um frasco contendo dois explantes (aglomerado de calo de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro), em meio de cultivo. O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da esterilização à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos com capacidade de 350 mL, de dimensão de 50 x 140 mm, contendo 30 mL de meio de cultura. Os explantes foram incubados em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas com irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes, luz do dia, com potência de 40 W, ou no escuro por aproximadamente 30 dias.

Nesta etapa foi avaliado o número de calos que formaram plântulas.

3.5 Aclimatização das plântulas

Para aclimatização, as plântulas foram retiradas dos frascos e suas raízes lavadas em água estéril, permanecendo por 5 dias dentro de bandejas, contendo água estéril, cobertas por plástico (mini estufa) no laboratório. Então foram levadas para casa de vegetação, sendo plantadas em vasos (10 L) com substrato comercial. A unidade experimental foi constituída por um vaso contendo uma plântula. Nos primeiros 10 dias, as plantas foram irrigadas 3 vezes ao dia, após este período, uma vez ao dia.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desinfestação

O método utilizado para desinfestação no presente estudo não se mostrou eficiente, sendo elevada a porcentagem de contaminação em todas as concentrações do regulador de crescimento avaliadas (superior a 35%) durante a indução da embriogênese somática (dados não apresentados). Isso pode ter ocorrido devido às condições de campo em que a planta se encontrava e ao clima no dia da coleta do material. Resultado contrastante foi encontrado por Sweby et al. (1994), que utilizaram protocolo que empregava apenas etanol e hipoclorito de sódio e, lograram grande produção de calos livres de contaminação, da variedade N18 de cana-de-açúcar.

Grattapaglia e Machado (1990) relataram que o estágio fisiológico e fitossanitário da fonte de explantes exercem grande influência no comportamento das culturas *in vitro*. Entretanto, há espécies em que o estabelecimento do cultivo *in vitro* se torna inviável apenas com o uso da assepsia normal e, neste caso, é necessário utilizar antibióticos, como é o caso da helicônia (Rodrigues, 2005) e da batata (Pereira et al., 2003).

4.2 Indução da embriogênese somática

A formação de calos ocorreu somente nos meios com presença da auxina 2,4-D, conforme Tabela 2 e Figura 1. Resultado similar foi encontrado por Ho e Vasil (1983) ao estudarem a formação de calos embriogênicos no clone 68-1067 de cana-de-açúcar. Raemakers et al. (1995) relatam que em angiospermas monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar, a embriogênese primária é exclusivamente induzida em meio contendo auxinas. Dentre as auxinas sintéticas, se destacam o Picloram, Dicamba e 2,4-D. Segundo

Grattapaglia e Machado (1990), as auxinas como o 2,4-D são essenciais para estimular a formação de calos, mesmo em baixas concentrações.

Tabela 1. Número de calos formados na presença e ausência do regulador de crescimento 2,4-D para todas as cultivares avaliadas

	Formação de calos	Não formou calos	Total
Ausência de 2,4-D	0	34	34
Presença de 2,4-D	120	15	135
Total	120	49	169

$X^2 = 104,24^*$, significativo ao nível de 5% de probabilidade, com um grau de liberdade.

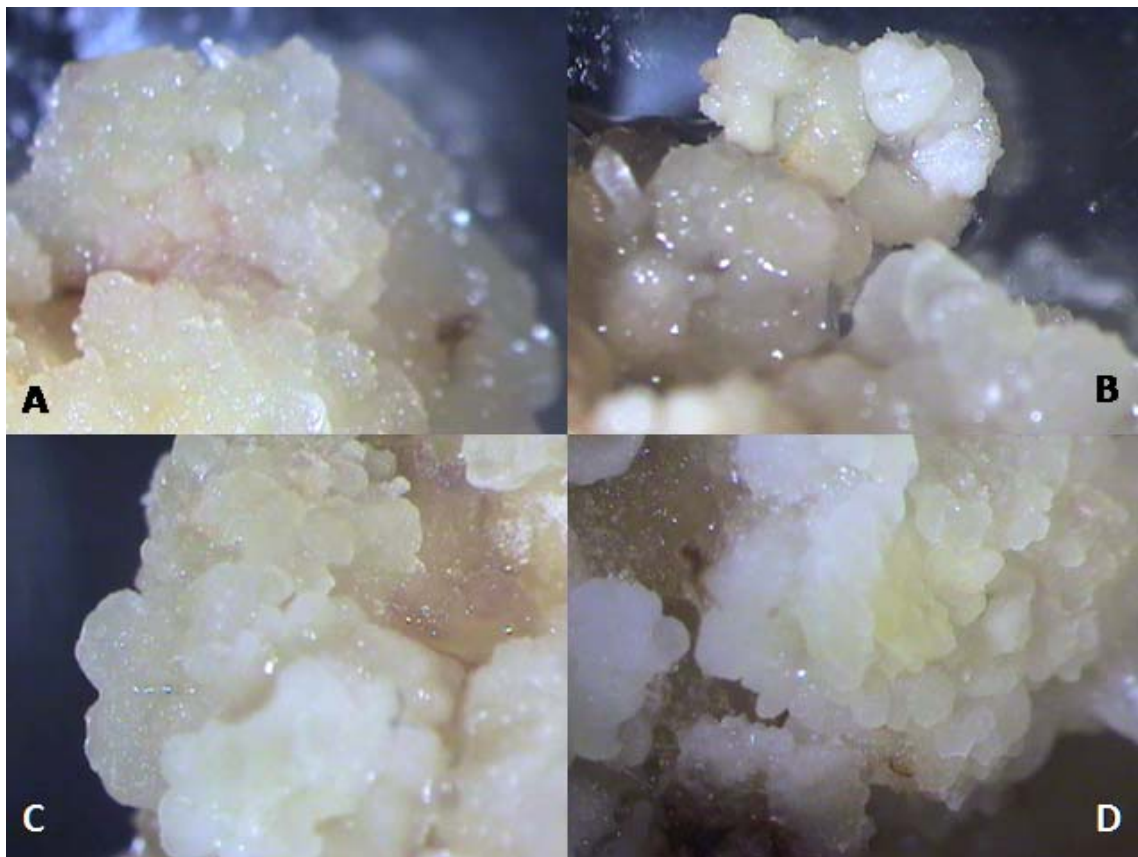


Figura 1. Formação de calos na presença da auxina 2,4-D. **A.** RB835486 sob 6 mg L⁻¹ de 2,4-D; **B.** RB855536 sob 1 mg L⁻¹ de 2,4-D; **C.** e **D.** RB928064 sob 3 e 9 mg L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente.

A auxina desencadeia importante papel na indução de calos embriogênicos em cana-de-açúcar. Para Ho e Vasil (1983), de todos os reguladores de crescimento, o 2,4-D se mostrou o mais eficiente para a indução de calos e formação de embriões somáticos em cultura de células e tecidos de gramíneas, incluindo a cana-de-açúcar. Várias concentrações de 2,4-D (0,5-3,0 mg L⁻¹) se mostraram eficientes para a indução de calos embriogênicos. Quando submetidos a altas concentrações deste regulador de crescimento, os calos ficam mais mucilaginosos. Ho e Vasil (1983) mencionam, ainda, que, neste caso, os calos embriogênicos demandam mais tempo para se formarem.

No presente trabalho, a presença de 2,4-D foi fundamental para a indução de calos (Figura 1). Contudo, não houve diferença significativa na formação de calos ($p < 0,05$), sob os diferentes níveis de 2,4-D pelo teste qui-quadrado (Tabela 3). Verificou-se também que não houve diferença significativa entre as cultivares avaliadas na presença do regulador (Tabela 4).

Tabela 2. Número de calos formados na presença dos diferentes níveis de 2,4-D para as três cultivares avaliadas

[] de 2,4-D	Formação de calos	Não formou calos	Total
1	39	5	44
3	26	0	26
6	39	8	47
9	16	2	18
Total	120	15	135

$\chi^2 = 4,96^{n.s.}$, não significativo ao nível de 5% de probabilidade, com três graus de liberdade.

Tabela 3. Número de calos formados na presença de 2,4-D, para as três cultivares em análise

	Formação de calos	Não formou calos	Total
RB928064	68	9	77
RB835486	38	4	42
Total	106	13	119
$\chi^2 = 0,13^{n.s.}$			
RB928064	68	9	77
RB855536	14	2	16
Total	82	11	93
$\chi^2 = 0,01^{n.s.}$			
RB835486	38	4	42
RB855536	14	2	16
Total	52	6	58
$\chi^2 = 0,11^{n.s.}$			

Nota: ^{n.s.} Não significativo a 5% de probabilidade com um grau de liberdade.

Ho e Vasil (1983) descrevem a influência que o genótipo tem sobre as condições de cultivo *in vitro*. O estágio de desenvolvimento do explante, idade e sua posição na planta matriz influencia fortemente a indução de calos embriogênicos. Desai et al. (2004) identificaram explantes e combinações próprias de reguladores de crescimento para a indução da embriogênese somática direta em cultivar indiana de cana-de-açúcar (CoC-671). Estes autores verificaram que a resposta da cultura embriogênica de segmentos de inflorescências imaturas foi diretamente relacionada à presença de reguladores de crescimento adequados.

4.3 Multiplicação dos calos embriogênicos

Na fase de multiplicação de calos, pode-se observar pela Tabela 5 e Figura 2 que não houve diferença estatística entre as variedades estudadas a 5% de probabilidade. Entretanto, o regulador de crescimento 2,4-D afetou a multiplicação de calos, assim como a interação entre variedade e a auxina. Raemakers et al. (1995) relatam que, em geral, meios contendo auxina e/ou auxina/citocinina são usados na embriogênese somática de espécies gimnospermas e angiospermas monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar.

Tabela 4. Análise de variância entre variedade, hormônio e a interação entre variedade e hormônio

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	Fc
Cultivar	2	13,21	6,60	2,8
2,4-D	2	235,86	117,93	51,3*
Cultivar x 2,4-D	4	273,06	68,27	29,6*
Erro	593	1363,06	2,29	
C. V.	49,77%			
Média Geral	3,05			

Nota: *Significativo a 5% de probabilidade.

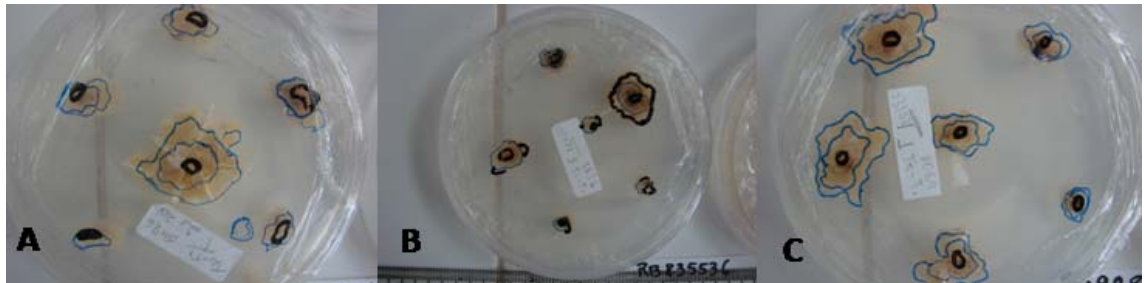


Figura 2. Expansão dos calos, indicada pelo contorno dos mesmos durante a avaliação. **A.** RB835486 sob 3 mg L^{-1} de 2,4-D; **B.** RB855536 sob 1 mg L^{-1} de 2,4-D; **C.** RB928064 sob 1 mg L^{-1} de 2,4-D.

A Figura 3 explica a variação dos dados encontrados na cultivar RB835486. Neste caso observou-se efeito quadrático ao nível de 1% de probabilidade (Anexo 1). Ao analisar as médias, constatou-se maior expansão dos calos cultivados em meio 3 mg L^{-1} de 2,4-D (Tabela 6). Nesse tratamento, verificou-se que os calos tinham aspecto gelatinoso, alguns dos quais esbranquiçados, em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 4). Os calos em meios de cultura com 1 mg L^{-1} de 2,4-D eram compactos, globulares, opacos, com oxidação (Figura 5). Aqueles calos cultivados em meio de cultura com 6 mg L^{-1} de 2,4-D mostraram coloração opaco-amarelada, em diferentes estágios de desenvolvimento, com oxidação (Figura 6). Lima et. al. (2001) também descrevem os diferentes tipos de calos gerados para as variedades estudadas em seu experimento (RB739735 e RB72454) em meio de cultura contendo o regulador de crescimento 2,4-D, sendo que os calos considerados mais embriogênicos seriam aqueles globulares, friáveis e sem oxidação.

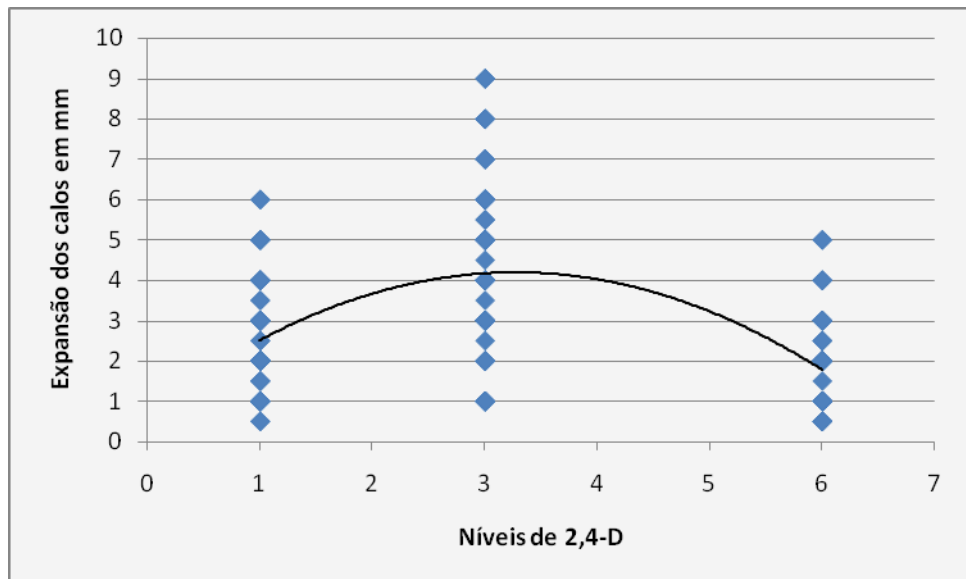


Figura 3. Expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB835486.

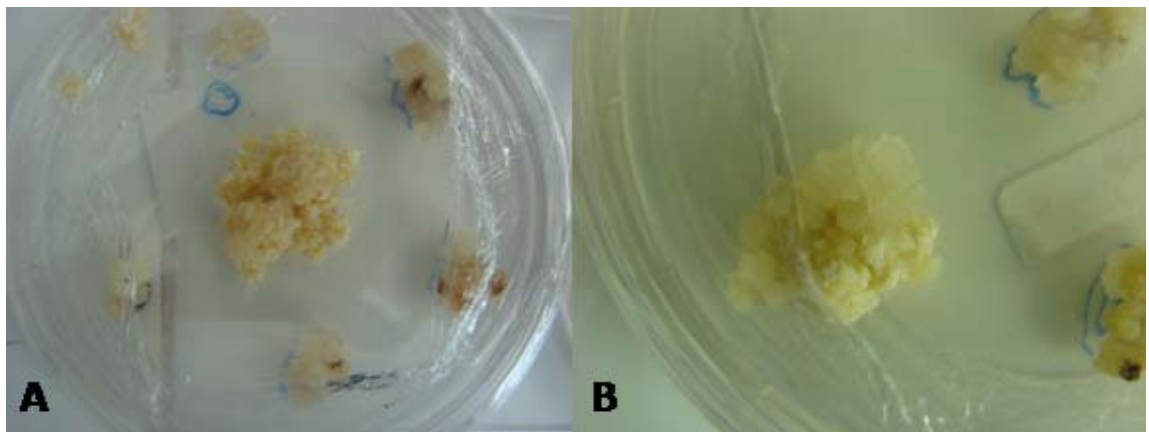


Figura 4. Expansão dos calos da cultivar RB835486 cultivados com 3 mg L^{-1} de 2,4-D. **A.** Placa de petri com oito aglomerados de calos; **B.** Detalhe de um aglomerado de calos.



Figura 5. Multiplicação dos calos RB835486 em meio de cultura contendo 1 mg L⁻¹ de 2,4-D



Figura 6. Multiplicação dos calos RB835486 em meio de cultura contendo 6 mg L⁻¹ de 2,4-D.

No caso da cultivar RB855536 verificou-se que houve efeito quadrático ao nível de 1% de probabilidade (Anexo 2). A figura 8 mostra decréscimo na expansão dos calos, conforme a concentração do regulador de crescimento aumentava. Sob 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, os calos se apresentavam compactos, globulares e opacos (Figura 7). Quando submetidos a 3 mg L⁻¹ do regulador, os calos estavam com aspecto gelatinoso, globular e translúcido (Figura 9). A concentração máxima de 2,4-D (6 mg L⁻¹) nesta etapa, deixou os calos opacos e em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 10).



Figura 7. Multiplicação dos calos da cultivar RB855536 em meio de cultura contendo 1 mg L^{-1} de 2,4-D

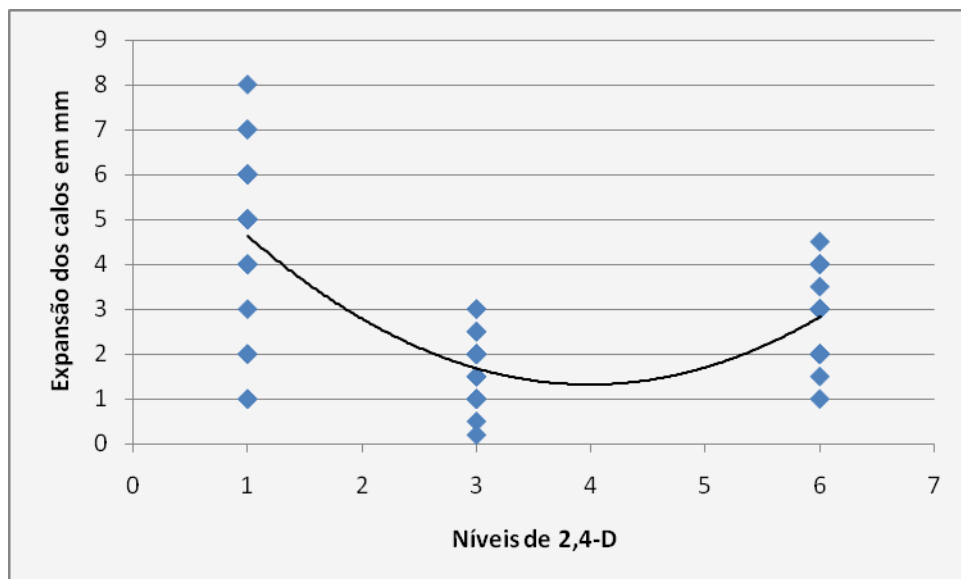


Figura 8. Expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB855536.

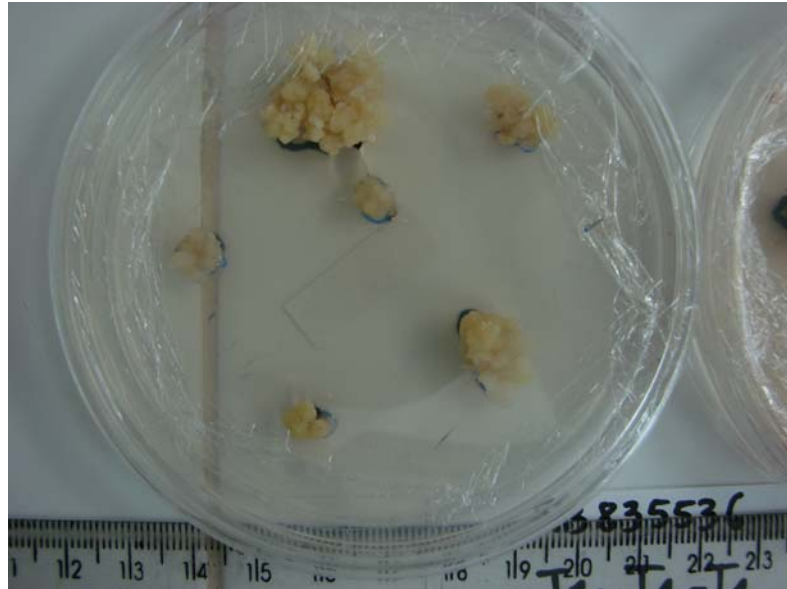


Figura 9. Multiplicação dos calos da cultivar RB855536 em meio de cultura contendo 3 mg L^{-1} de 2,4-D



Figura 10. Multiplicação dos calos da cultivar RB855536 em meio de cultura contendo 6 mg L^{-1} de 2,4-D

Tabela 5. Expansão em mm dos calos embriogênicos de cada tratamento do regulador de crescimento 2,4-D, para cada cultivar

Clones	Exp. Máx.	Exp. Mín.	Exp. Média	% Contaminados
1 mg L⁻¹				
RB928064	7,3	1,7	4,2	8,3
RB835486	4,7	1	2,5	6,6
RB855536	6,7	1,7	4,4	12,5
3 mg L⁻¹				
RB928064	5,3	1,3	3,1	8,3
RB835486	6,7	1,3	4,1	10
RB855536	2,5	1	1,7	12,5
6 mg L⁻¹				
RB928064	4,7	1	2,3	11,1
RB835486	3	0,7	1,7	10
RB855536	3,8	2,2	2,8	12,5

Nota: Em negrito estão as maiores médias de expansão de cada clone.

Para a cultivar RB928064 verificou-se que não houve efeito quadrático, apenas, linear, conforme disposto no Anexo 3. Com base na figura 11, se observa que houve decréscimo na expansão dos calos, conforme aumentou a concentração do 2,4-D no meio de cultura. Os calos expostos a 1 mg L⁻¹ do referido fitorregulador mostraram-se compactos, opaco-amarelados, globulares e em constante multiplicação (Figura 12). Sob 3 mg L⁻¹, os calos ficaram compactos, amarelados, alguns esbranquiçados, e em multiplicação constante (Figura 13). Quando submetidos a 6 mg L⁻¹ do regulador, os calos ficaram opaco-amarelados (Figura 14).

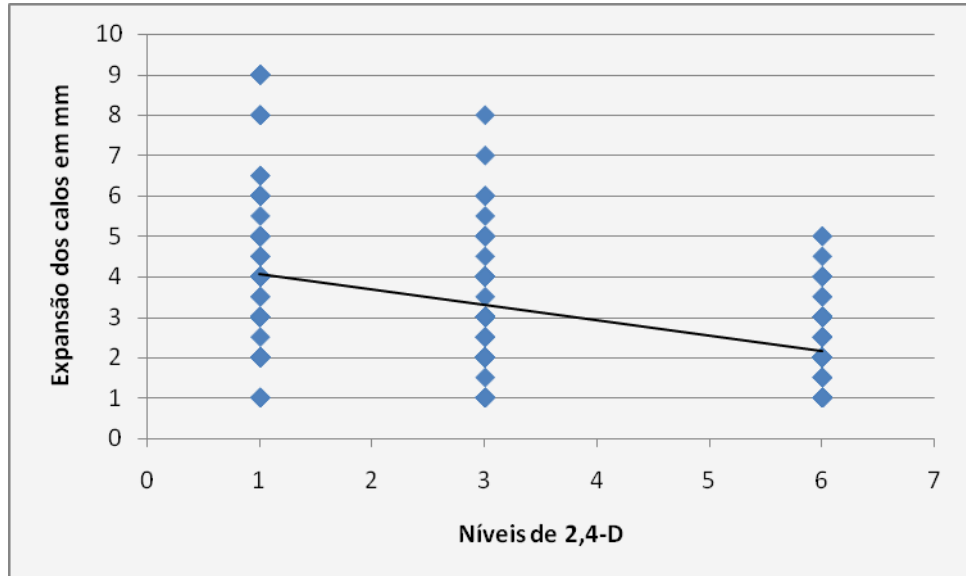


Figura 11. Expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB928064.

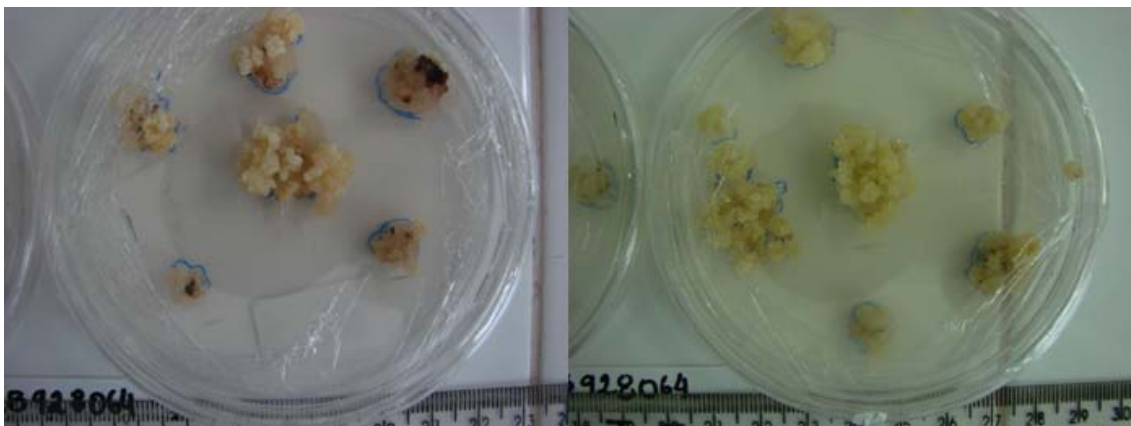


Figura 12. Multiplicação dos calos da cultivar RB928064 em meio de cultura contendo 1 mg L^{-1} de 2,4-D.

Assim, pode-se afirmar que, dentre os tratamentos avaliados, 1 mg L^{-1} de 2,4-D foi o melhor tratamento para a multiplicação de calos embriogênicos nos genótipos RB928064 e RB855536, enquanto que, para a cultivar RB835486, o melhor tratamento é o que contém 3 mg L^{-1} de 2,4-D no meio de cultura. Ainda de acordo com a Tabela 6, é possível afirmar que o regulador de crescimento 2,4-D, quando presente em altas concentrações (6 mg L^{-1}) é desfavorável para a multiplicação de calos embriogênicos. Resultado similar foi encontrado por Sweby et. al. (1994), ao estudarem a variedade N18 de cana-de-açúcar. Eles verificaram que os calos multiplicados sob baixas concentrações (1 mg L^{-1}) de

2,4-D foram tão vigorosos, quanto àqueles submetidos a altas concentrações (3 mg L^{-1}).

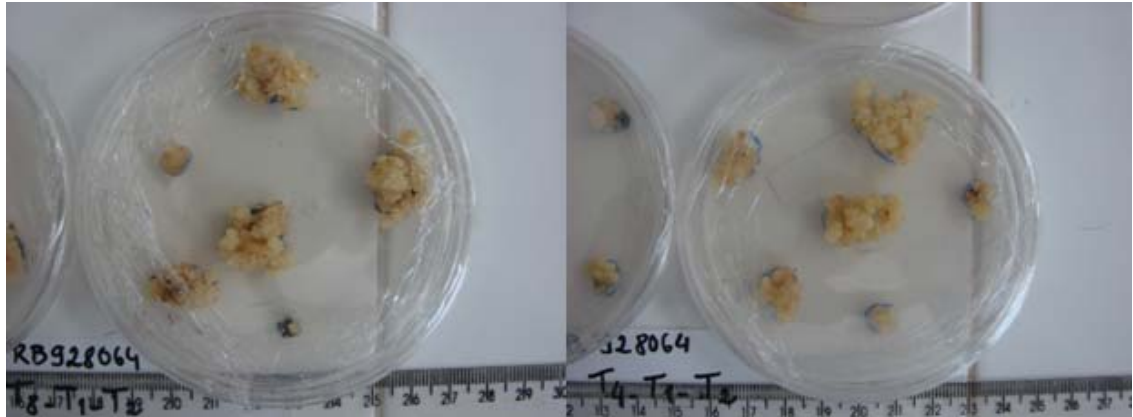


Figura 13. Multiplicação dos calos da cultivar RB928064 em meio de cultura contendo 3 mg L^{-1} de 2,4-D.

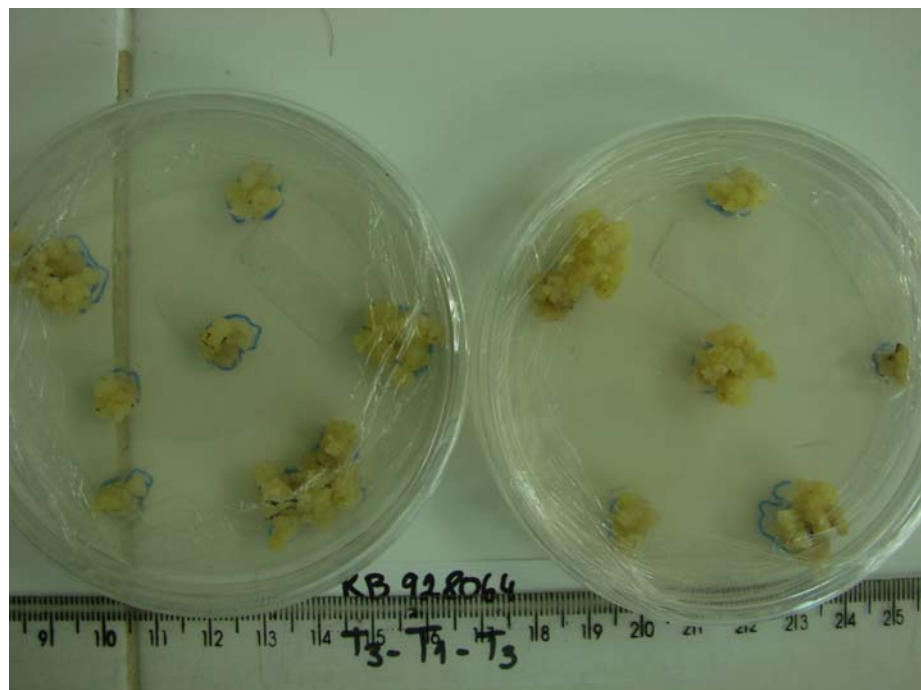


Figura 14. Multiplicação dos calos da cultivar RB928064 em meio de cultura contendo 6 mg L^{-1} de 2,4-D.

4.4 Maturação e germinação *in vitro* de embriões somáticos

A presença ou ausência de sacarose no meio de cultura não influenciou significativamente a germinação dos embriões somáticos (Figura 15). O mesmo foi observado nos calos cultivados sob o fotoperíodo de 16 horas-luz (claro) ou

no escuro, durante os 30 dias de cultivo (Tabelas 7, 8 e 9) para as três cultivares analisadas.

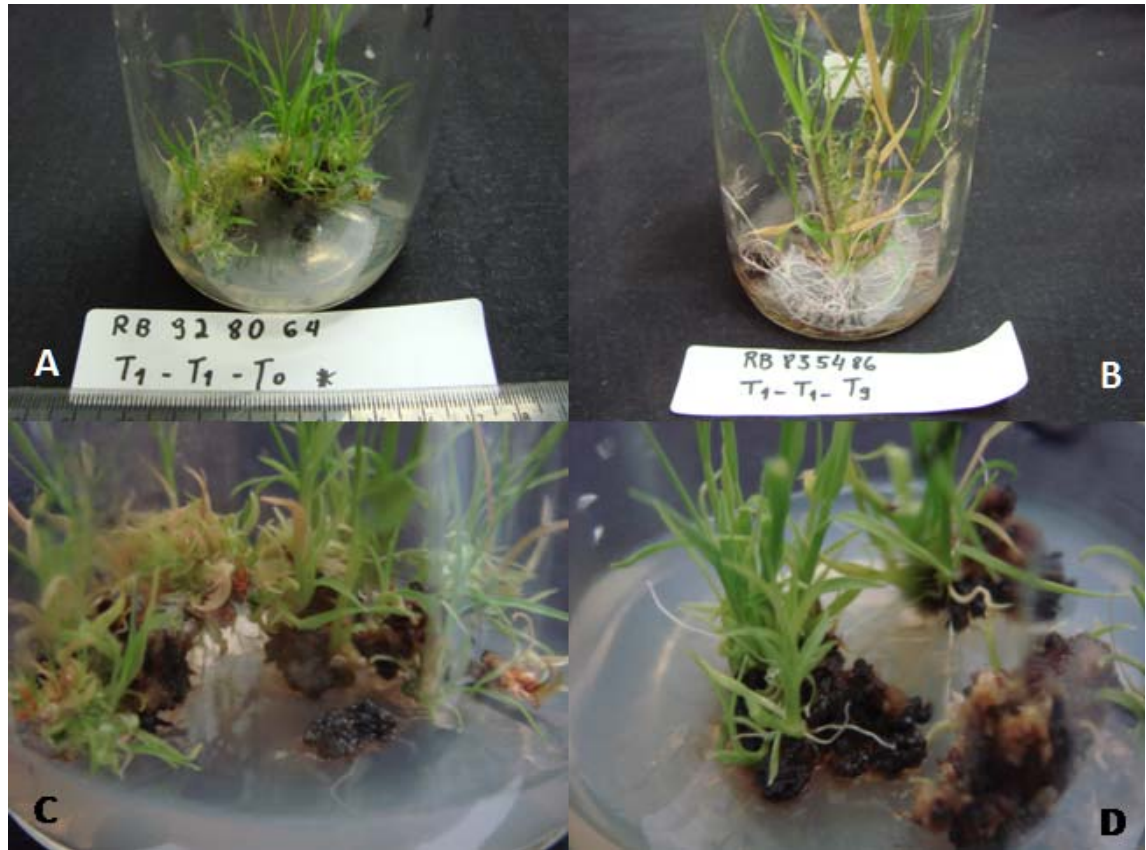


Figura 15. Germinação dos embriões somáticos sob os diferentes tratamentos: **A.** Escuro + 0 g L⁻¹ de sacarose; **B.** Escuro + 60 g L⁻¹ de sacarose; **C.** Claro + 0 g L⁻¹ de sacarose; **D.** Claro + 60 g L⁻¹ de sacarose.

Ho e Vasil (1983) afirmaram que a sacarose influencia na germinação dos embriões somáticos. Segundo esses autores, a sacarose, quando presente no meio de cultura, estimula, não apenas a diferenciação, senão também o crescimento radicular em cana-de-açúcar. A germinação dos embriões é promovida pela presença de zeatina ou ácido giberélico. Para Litz e Gray (1995), o meio usado para maturação dos embriões somáticos deve conter aminoácidos essenciais e complexos orgânicos. As auxinas, freqüentemente, são preteridas no meio, em razão do seu efeito inibitório na maturação dos calos de muitas espécies.

Tabela 6. Número de plântulas que desenvolveram (D.) e que não desenvolveram (N. D.) da cultivar RB928064 e, seus respectivos X^2 calculados para os diferentes tratamentos.

	D.	N. D.	Total		D.	N. D.	Total
T1	11	21	32	T1	11	21	32
T2	9	23	32	T3	12	12	24
Total	20	44	64	Total	23	33	56
$X^2 = 0,29$				$X^2 = 1,38$			
T1	11	21	32	T2	9	23	32
T4	6	18	24	T3	12	12	24
Total	17	39	56	Total	21	35	56
$X^2 = 0,57$				$X^2 = 2,80$			
T2	9	23	32	T3	12	12	24
T4	6	18	24	T4	6	18	24
Total	15	41	56	Total	18	30	48
$X^2 = 0,07$				$X^2 = 3,20$			

Nota: T1 = Meio MS + Claro; T2 = Meio MS + Claro + 60 g L⁻¹ de Sacarose; T3 = Meio MS + Escuro; T4 = Meio MS + Escuro + 60 g L⁻¹ de Sacarose.

Tabela 7. Número de plântulas que desenvolveram (D.) e que não desenvolveram (N. D.) da cultivar RB835486 e, seus respectivos X^2 calculados para os diferentes tratamentos.

	D.	N. D.	Total		D.	N. D.	Total
T1	1	13	14	T1	1	13	14
T2	1	13	14	T3	1	7	8
Total	2	26	28	Total	2	20	22
$X^2 = 0,00$				$X^2 = 0,18$			
T1	1	13	14	T2	1	13	14
T4	2	6	8	T3	1	7	8
Total	3	19	22	Total	2	19	22
$X^2 = 1,38$				$X^2 = 0,18$			
T2	1	13	14	T3	1	7	8
T4	2	6	8	T4	2	6	8
Total	3	19	22	Total	3	13	16
$X^2 = 1,38$				$X^2 = 0,41$			

Nota: T1 = Meio MS + Claro; T2 = Meio MS + Claro + 60 g L⁻¹ de Sacarose; T3 = Meio MS + Escuro; T4 = Meio MS + Escuro + 60 g L⁻¹ de Sacarose.

Tabela 8. Número de plântulas que desenvolveram (D.) e que não desenvolveram (N. D.) da cultivar RB855536 e, seus respectivos χ^2 calculados para os diferentes tratamentos.

	D.	N. D.	Total		D.	N. D.	Total
T1	2	2	4	T1	2	2	4
T2	0	4	4	T3	0	4	4
Total	2	6	8	Total	2	6	22
$\chi^2 = 2,67$				$\chi^2 = 2,67$			
T1	2	2	4	T2	0	4	4
T4	0	4	4	T3	0	4	4
Total	2	6	22	Total	0	8	8
$\chi^2 = 2,67$				$\chi^2 = \text{N. P.}$			
T2	0	4	4	T3	0	4	4
T4	0	4	4	T4	0	4	4
Total	0	8	8	Total	0	8	8
$\chi^2 = \text{N. P.}$				$\chi^2 = \text{N. P.}$			

Nota: T1 = Meio MS + Claro; T2 = Meio MS + Claro + 60 g L⁻¹ de Sacarose; T3 = Meio MS + Escuro; T4 = Meio MS + Escuro + 60 g L⁻¹ de Sacarose.

N. P. = Não foi possível calcular.

Raemakers et. al. (1995) mencionam que a maturação insuficiente dos embriões somáticos traduzem mal desenvolvimento (germinação) dos mesmos e/ou a formação de folhas grossas com hastes fasciculadas. Este fenômeno foi observado em inúmeras espécies e é conhecido como germinação precoce. Na germinação precoce, o desenvolvimento do embrião pula os estágios normais da embriogênese e adquire características de um seedling mal-formado. Litz e Gray (1995) observaram que a germinação precoce ou prematura é o maior problema durante o desenvolvimento dos embriões somáticos e isso pode ser controlado pelo aumento da osmolaridade do meio de maturação, adicionando sacarose ou ácido abscísico.

Sweby et. al. (1994) encontraram alto potencial de formação de plântulas a partir de calos cultivados em meio MS contendo caseína hidrolisada e sacarose, da variedade N18 de cana-de-açúcar. Neste caso, a germinação foi observada duas semanas após os calos terem sido transferidos para o meio de multiplicação sob fotoperíodo de 14 horas-luz.

4.5 Aclimatização das plântulas

Apesar do limitado número de plântulas formadas, pode-se considerar pleno êxito o processo de aclimatização das plântulas. Pois, do total de 44 plântulas formadas, 26 sobreviveram ao processo de aclimatização, o que corresponde a 59%, conforme pode-se observar pela Tabela 10 e Figura 16.

Tabela 9. Número de plantas que sobreviveram ou não ao processo de aclimatização, a partir do total de plântulas formadas em cada tratamento e para cada cultivar.

Tratamento	Cultivar	Sobreviveu	Não sobreviveu	Total formadas
MS + Claro	RB928064	7	4	11
	RB835486	1	0	1
	RB855536	1	1	2
MS + Claro + Sacarose	RB928064	6	3	9
	RB835486	0	1	1
	RB855536	0	0	0
MS + Escuro	RB928064	6	6	12
	RB835486	1	0	1
	RB855536	0	0	0
MS + Escuro + Sacarose	RB928064	5	1	6
	RB835486	0	2	2
	RB855536	0	0	0
Total		26	14	44

Segundo Grattapaglia e Machado (1990), a manutenção da umidade relativa alta desde a retirada das plantas do meio de cultura até se verificar a retomada do crescimento da planta é um fator chave para sua sobrevivência.



Figura 16. Aclimatização das plantas formadas, sob os diferentes tratamentos: **A.** Claro + 0 g L⁻¹ de sacarose; **B.** Claro + 60 g L⁻¹ de sacarose; **C.** Escuro + 0 g L⁻¹ de sacarose; **D.** Escuro + 60 g L⁻¹ de sacarose.

5. CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento, os resultados obtidos permitiram concluir que:

- As concentrações de 2,4D de 1, 3, 6 e 9 mg L⁻¹ são igualmente eficazes na indução da embriogênese somática.
- A expansão dos calos foi maior com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D para as cultivares RB855536 e RB928064, e em torno de 3 mg L⁻¹ de 2,4-D para a RB835486.
- A presença ou ausência de sacarose no meio de cultivo não afetou a germinação dos embriões somáticos. O mesmo foi observado nos calos mantidos no claro ou escuro, durante seu cultivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R.S., **Identificação e caracterização de genes de transportadores de fósforo em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Piraciacaba, 2003. Dissertação (Mestrado) – Esalq - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- AMALRAJ, V. A.; BALASUNDARAM, N. On the taxonomy of the members of 'Saccharum complex'. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 35-41, 2006.
- CHENGALRAYAN, K.; GALLO-MEAGHER, M. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. **In vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v.37, p.434-439, 2001.
- CONAB, 2007. <http://www.conab.gov.br/conabweb/>, capturada em 15/04/2007.
- DESAI, N. S.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Current Science**, v. 87, p. 764-768, 2004.
- D'HONT, A. D.; RAO, P. S.; FELDMANN, P.; GRIVET, L. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridisation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 320-326, 1995.
- D'HONT, A.; PAULET, F.; GLASZMANN, J. C. Oligoclonal interespecific origino of 'north indian' and 'chinese' sugarcanes. **Chromosome Research**, v. 10, p. 253-262, 2002.
- FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A.; GLORIA, B.A. da. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum sp.* **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.93-97, 1996.

- FITCH, M.M.M.; MOORE, P.H. Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.20, p.157-163, 1990.
- GALLO-MEAGHER, M.; ENGLISH, R.G.; ABOUZID, A. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.36, p.37-40, 2000.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. ed. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA – CNPH, p. 99-169, 1990.
- GRIVET, L.; GLASZMANN, J. C.; ARRUDA, P. Sequence polymorphism from EST data in sugarcane: a fine analysis of 6-phosphogluconate dehydrogenase genes. **Genetic and Molecular Biology**, v. 24, p. 1-8, 2001.
- GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 2, p. 9-17, 2004.
- HO, W. J.; VASIL, I. K. Somatic Embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, v. 118, p. 169-180, 1983.
- IRVINE, J. E. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 186-194, 1999.
- JANOO, N.; GRIVET, L.; DOOKUN, A.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C. Evaluation of the genetic base of sugarcane cultivars and structuration of the diversity at the chromosome level using molecular markers. **Food and Agricultural Research Council**, v. 1, p. 123-135, 1999.
- KOBLITZ ENERGIAS RENOVÁVEIS, 2007. <http://www.koblitz.com.br/>, capturada em 12/04/2007.
- KOSSMANN, J.; GROENEWALD, J. H.; BOTHA, F. C. Metabolic engineering of sucrose accumulation in sugarcane. **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 295, 2007.

- LEBOT, V. Biomolecular evidence for plant domestication in Sahul. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 46, p. 619-628, 1999.
- LEE, T. S. G. Produção de mudas sadias de cana-de-açúcar através da técnica de cultura de tecidos. **Álcool & Açúcar**, v. 45, p. 20-25, 1988.
- LIMA, M. A. C.; GARCIA, R. O.; MARTINS, G. S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agents seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 73-77, 2001.
- LITZ, R.E. & GRAY, D.J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World journal of Microbiology & Biotechnology**, v.11, p.416-425, 1995.
- MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F. e ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: Borém, A. ed. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2 ed. Viçosa, UFV, p. 205-251, 1999a.
- MUKHERJEE, S. K. Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette**, v. 119, p. 55-61, 1957.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NAIR, N. V.; SELVI, A.; SREENIVASAN, T. V.; PUSHPALATHA, K. N.; MARY, S. Characterization of intergeneric hybrids of *Saccharum* using molecular markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 163-169, 2006.
- PEDROZO, 2006. **Eficiência da seleção em fases iniciais no melhoramento da cana-de-açúcar**. Viçosa, 2006. Dissertação (Mestrado) – UFV – Universidade Federal de Viçosa.
- PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1-13, 2003.

- PREECE J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 1, p. 26-37, 1995.
- PRICE, S. Cytogenetics of modern sugarcane. **Economic Botany**, v. 17, p. 97-105, 1963.
- PROCANA, 2007. <http://www.jornalcana.com.br/>, capturada em 10/04/2007.
- RAEMARKERS, C.J.J.M.; JACOBSEN, E. & VISSER, R.G.F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v. 81, p. 93-107. 1995.
- RIVA, G. A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.; AYRA-PARDO, C. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1. 1998.
- RODRIGUES, P. H. V. *In vitro* establishment of *Heliconia raulianiana* (Heliconiaceae). **Scientia Agricola**, v. 62, p. 1-6, 2005.
- SÃO PAULO ETHANOL SUMMIT, 2007. <http://www.ethanolsummit.com/>, capturada em 12/04/2007.
- SCHENCK, S.; CREPEAU, M. W.; WU, K. K.; MOORE, P. H.; YU, Q.; MING, R. Genetic diversity and relationships in native hawaiian *Saccharum officinarum* sugarcane. **Journal of Heredity**, v. 95, p. 327-331, 2004.
- SUCEST-FUN PROJECT, 2007. <http://sucestfun.cbmeg.unicamp.br/sucestfun/>, capturada em 27/07/2007.
- SWEBY, D. L.; HUCKETT, B. I.; BOTHA, F. C. Minimising somaclonal variation in tissue cultures of sugarcane. **Proceedings of The South African Sugar Technologists Association**, v. 1, p. 46-50, 1994.
- TAYLOR, P.W.J.; KO, H.L.; ADKINS, S.W.; RATHUS, C.; BIRCH, R.G. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.28, p.69-78, 1992.
- TAYLOR, P.W.J.; DUKIC, S. Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum* spp. hybrid germplasm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.34, p.217-222, 1993.

TEIXEIRA, L. H. M. **Mapeamento funcional em cana-de-açúcar utilizando ESTs como marcadores moleculares**. Campinas, 2006. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas.

ULIAN, E. C. Desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas visando tolerância ao estresse hídrico. In: **V Workshop de Melhoramento Genético e Biotecnologia da Cana-de-Açúcar**, 2007. Disponível: <http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/Position%20paper-sessao%208%20-%20Eugenio.pdf>, capturado em 02/01/2008.

UNICA, 2007. <http://www.unica.com.br/>, capturada em 10/07/ 2007.

ANEXO

Tabela 10. Resumo da análise de regressão⁺ para expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB835486
Somadas de quadrados seqüenciais - Tipo I (Type I)

Causas de variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	Fc
b1	1	43.75	43.75	15.33**
b2	1	171.57	171.57	60.125**
Resíduo	238	679.13	2.85	

** Significativo ao nível 1% de probabilidade

⁺: Desvio da regressão nulo

Tabela 11. Resumo da análise de regressão⁺ para expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB855536
Somadas de quadrados seqüenciais - Tipo I (Type I)

Causas de variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	Fc
b1	1	19.17	19.17	7.88**
b2	1	54.53	54.53	22.43**
Resíduo	62	150.75	2.43	

** Significativo ao nível 1% de probabilidade

⁺: Desvio da regressão nulo

Tabela 12. Resumo da análise de regressão⁺ para expansão dos calos em milímetros (mm) sob os diferentes níveis de 2,4-D para a cultivar RB928064
Somadas de quadrados seqüenciais - Tipo I (Type I)

Causas de variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	Fc
b1	1	173.84	173.84	64.97**
b2	1	7.13	7.13	2.66 ^{ns}
Resíduo	286	765.23	2.68	

** Significativo ao nível 1% de probabilidade

⁺: Desvio da regressão nulo