

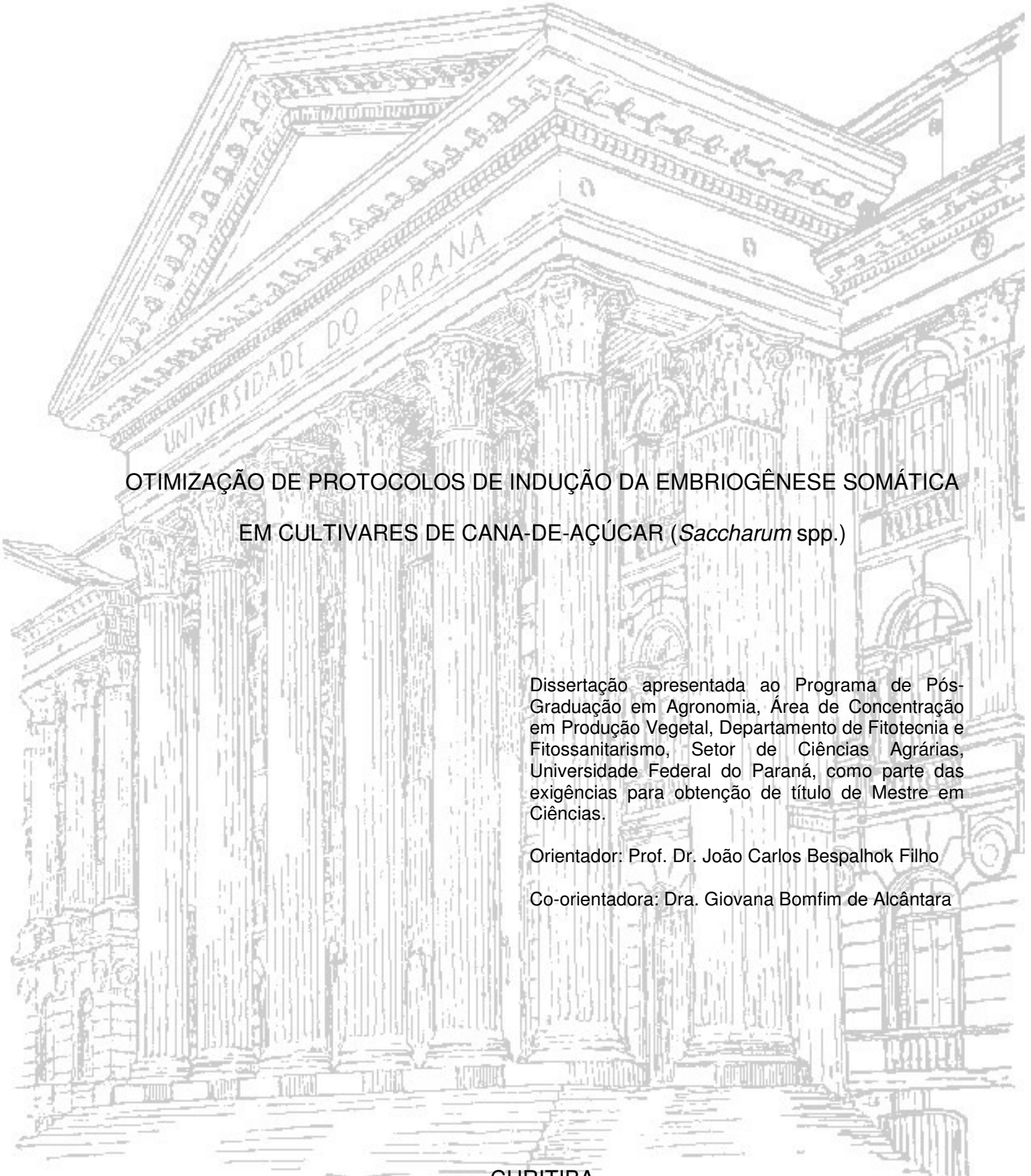
CLARISSA DE SOUZA MUDRY

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA
EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

CURITIBA

2011

CLARISSA DE SOUZA MUDRY



OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA
EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bernalhok Filho

Co-orientadora: Dra. Giovana Bomfim de Alcântara

CURITIBA

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **CLARISSA DE SOUZA MUDRY**, sob o título "**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*)**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2011.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Professor Dr. Rodrigo Kelson Silva Rezende
Primeiro Examinador

Dra. Giovana Bomfim de Alcântara
Segunda Examinadora

Dr. Roberson Dibax
Terceiro Examinador

Professor Dr. João Carlos Bespalkok Filho
Presidente da Banca e Orientador

DEDICO

A Deus e aos Guias por todas as barreiras e o auxílio para vencê-las. Ao meu companheiro e amigo Ronie Robert Pinheiro pelo apoio, compreensão e incentivo.

OFEREÇO

À minha família, importante em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho, por me apoiar e incentivar na caminhada entre Iniciação Científica e Mestrado. Obrigada pelo voto de confiança e auxílio nos momentos mais difíceis dessa jornada.

Aos co-orientadores Prof. Dr. Edelclaiton Daros, Prof. Dr. José Luis Camargo Zambon, Prof. Dr. Ricardo de Oliveira e Dra. Giovana Bomfim de Alcântara pelo apoio e confiança no trabalho realizado.

À UFPR e PPGAPV pela oportunidade de realizar o mestrado e a CAPES pela concessão da bolsa.

Aos amigos do Projeto Cana-de-açúcar: Diego K. K. de Souza, Valéria Lopes, Guilherme G. de Oliveira Figueiredo, Roberson Dibax e Airton Domingos dos Santos pela atenção, ajuda e companheirismo.

À Lucimara Antunes pela ajuda em todos os momentos burocráticos e pela companhia agradável, e Maria Emília pelas conversas e momentos de descontração. A Bárbara Guerreira pela amizade e professor Henrique pelo auxílio estatístico.

Aos colegas do Laboratório de Micropropagação de Plantas pelo convívio e auxílio em todos os momentos. Em especial ao amigo André Luís, pelas incontáveis horas de trabalho, companhia nas pizzarias e as conversas instrutivas.

Às amigas que estão sempre em meu coração apesar da distância: Norma, Renata, Taty, Veri, Tájuli, Marcelle e Lorena. E aos amigos: Carlos, Iverson, Lincoln e Ricardo, por terem sempre acreditado em mim, pelo ombro e amizade eterna.

Aos amigos Lucia e Luis Claudio (Maridão) Froufe, Luciana e Luis Arthur, (pai) Jussaro e (mãe) Tânia, Oales e Perla, Helviany, Alessandra, Gláucia, Fran, Márcio, Gustavo, Fernando e Tiago, Marcia e Admir, Priscila e Christian, Cinthia e Gian,

Andressa e Bel, e tantos outros amigos, por todos os momentos de agradável convívio. Amo vocês!

À Patrícia, Dirce e Milton Soares, que nos momentos de renovação estavam ao meu lado, me incentivando e auxiliando. Minha eterna gratidão!

À família Delalíbera, que acreditaram e incentivaram meus estudos e a continuação dessa caminhada. Vocês estarão sempre em meu coração. Muito obrigada!

*“Seja lá o que você puder fazer, ou
sonhar fazer, comece. Existe gênio,
poder e mágica na audácia.”*

Johann Wolfgang von Goethe

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais plantadas no mundo e o Brasil é o maior produtor e exportador de açúcar. Pensando no aumento dessas exportações, pesquisas vêm sendo realizadas para se conseguir cultivares mais resistentes a pragas e intempéries. Uma possibilidade é a transformação genética, porém são necessários aperfeiçoar os protocolos existentes de regeneração *in vitro* de plantas, pois cada cultivar de cana-de-açúcar responde de forma distinta em meio nutritivo. Nesse contexto, experimentos para obtenção de calos embriogênicos foram realizados, a fim de possibilitar estudos posteriores de transformação genética da cultura por biobalística. Diante disso, objetivou-se estabelecer protocolos de regeneração *in vitro* para três cultivares e um clone de cana-de-açúcar, visando a obtenção de calos embriogênicos. Sendo assim, os experimentos foram realizados em etapas, testando cinco concentrações de 2,4-D (1, 3, 9, 16 e 27 μM) em RB986419 e RB966928. Para o cultivar RB855156, analisou-se a influência da luminosidade e três concentrações de 2,4-D (3, 9 e 16 μM) sobre a formação de calos embriogênicos. Testes com diferentes meios de cultura (MS, MS/2 e MS/Fe) em cinco concentrações de 2,4-D (1, 3, 9, 16 e 27 μM) foram realizados no cultivar RB72454. Pôde-se concluir que a utilização de 9 μM para RB986419 e 16 μM de 2,4-D para o cultivar RB966928 propiciaram maiores formações de calos embriogênicos e regeneração de plantas. O cultivar RB855156 tem maiores porcentagens de formação da embriogênese somática no escuro, com reduzida oxidação dos explantes. A calogênese do cultivar RB72454 é mais facilmente obtida em meio de cultura com a redução dos macro e micronutrientes em concentrações de 9 e 16 μM de 2,4-D.

Palavras-chave: auxina, 2,4-D, calos embriogênicos, transformação genética, meio de cultura.

ABSTRACT

Sugarcane is the most planted crop in the world and Brazil is the largest producer and exporter of sugar. Research has been done to obtain sugarcane cultivars more resistant to pests and abiotic stresses with the aim to increase the exports. One possibility is the genetic transformation. However is necessary to optimize the plant in vitro regeneration protocol already used because each sugarcane cultivar respond quite differently to nutritious media. In this context, experiments to obtain embryogenic callus were carried out to enable further studies of genetic transformation of sugarcane by biolistic. In this way, the present work aimed to establish a regeneration protocol for three cultivars and one clone of sugarcane to achieve embryogenic callus. The experiments were carried out in stages which tested five 2,4-D concentrations (1, 3, 9 16, and 27 μM) in cultivars RB986419 and RB966928. The influence of the luminosity and the three concentrations of 2,4-D (3, 9 and 16 μM) on the formation of embryogenic callus in the RB855156 cultivar was analysed. Tests with different culture media (MS, MS half-strength and MS half-iron) and five concentrations of 2,4-D (1, 3, 9, 16 and 27 μM) was made with RB72454 cultivar. The results showed that the use of 9 μM of 2,4-D to RB986419 and 16 μM of 2,4-D to RB966928 cultivar promoted major embryogenic callus formation and plant regeneration. The RB855156 cultivar presented better response in percentage for somatic embriogenic formation in the dark and reduced oxidation of the explant. The calogenic process of RB72454 cultivar is obtained easier in culture media with the reduction of macro and micronutrient and at concentration of 9 and 16 μM of 2,4-D.

Keywords: auxin, 2,4-D, somatic embryogenesis, genetic transformation, culture medium.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos, em explantes de cana-de-açúcar, clone RB986419, após 40 dias de cultura.....	26
Tabela 2	Efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos, em explantes de RB986419, de cana-de-açúcar, após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	27
Tabela 3	Efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos, no cultivar RB966928 de cana-de-açúcar, após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	30
Tabela 4	Efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos, no cultivar RB966928 de cana-de-açúcar, após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	32
Tabela 5	Análise de variância dos dados da porcentagem de explantes provenientes do palmito de cana-de-açúcar, cultivar RB855156, analisadas em diferentes concentrações de 2,4-D e luminosidade, por 40 dias em meio de indução.....	45
Tabela 6	Porcentagem média de explantes formando calos embriogênicos em cana-de-açúcar, comparando meio de indução e luminosidade.....	46
Tabela 7	Porcentagem média de explantes formando calos não embriogênicos em cana-de-açúcar, comparando meio de indução e luminosidade.....	46
Tabela 8	Porcentagem média de explantes oxidados em cana-de-açúcar, comparando meio de indução e luminosidade.....	47
Tabela 9	Análise de variância dos dados da porcentagem de explantes provenientes do palmito de cana-de-açúcar, cultivar RB72454, analisadas em cinco concentrações de 2,4-D e três meios de indução, por 40 dias.....	59
Tabela 10	Porcentagem média de explantes formando calos embriogênicos em cana-de-açúcar, cultivar RB72454.....	60

Tabela 11	Porcentagem média de explantes formando calos não embriogênicos em cana-de-açúcar, cultivar RB72454.....	61
Tabela 12	Porcentagem média de explantes oxidados em cana-de-açúcar, cultivar RB72454.....	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Etapas da regeneração de cana-de-açúcar, clone RB986419. Desenvolvimento inicial de calos embriogênicos (A); Detalhe do calo embriogênico (B); calo embriogênico com brotações (C); Desenvolvimento inicial de plântulas (D); Desenvolvimento e enraizamento *in vitro* das plântulas (E); Plantas em casa de vegetação (F)..... 29
- Figura 2 Etapas da regeneração do cultivar RB966928. Calos embriogênicos (A), brotações de plântulas em meio de regeneração (B), plantas de cana-de-açúcar *in vitro* enraizadas (C) e desenvolvimento em casa de vegetação (D)..... 33
- Figura 3 Etapas da regeneração do 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)..... 49
- Figura 4 Etapas da regeneração do cultivar RB72454. Formação de calos embriogênicos em: meio MS (A), meio MS/2 (B) e meio MS/Fe (C). Desenvolvimento de plântula albina *in vitro* (D)..... 63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cana-de-açúcar.....	3
2.2 Cultura de tecidos.....	4
2.2.1 Embriogênese somática.....	5
2.2.2 Fatores que influenciam a embriogênese somática em cana-de-açúcar.....	7
2.2.3 Cana-de-açúcar transgênica.....	8
2.5 REFERÊNCIAS	11
3 CAPÍTULO I: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CULTIVAR RB966928 E DO CLONE RB986419 DE CANA-DE-AÇÚCAR (<i>Saccharum spp.</i>)	
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
3.1 INTRODUÇÃO.....	19
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.2.1 Local de realização, origem do material e assepsia.....	21
3.2.2 Meio de indução e condições iniciais de cultura <i>in vitro</i>	22
3.2.3 Regeneração do material vegetal.....	22
3.2.4 Aclimação do material regenerado.....	23
3.2.5 Análise estatística.....	24
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.3.1 Clone RB986419.....	25
3.3.2 Cultivar RB966928.....	28
3.4 CONCLUSÕES.....	34
3.5 REFERÊNCIAS.....	35
4 CAPÍTULO II: INTENSIDADE LUMINOSA E CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CULTIVAR DE CANA-DE-AÇÚCAR RB855156	
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
4.1 INTRODUÇÃO.....	40
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42

4.2.1 Origem do material e assepsia.....	42
4.2.2 Meio de indução e condições iniciais de cultura <i>in vitro</i>	42
4.2.3 Regeneração <i>in vitro</i> , e condições <i>ex vitro</i>	43
4.2.4 Análise estatística.....	44
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.4 CONCLUSÕES.....	50
4.5 REFERÊNCIAS.....	51
5 CAPÍTULO III: INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E 2,4-D NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR (<i>Saccharum</i> spp.), CULTIVAR RB72454	
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
5.1 INTRODUÇÃO.....	55
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
5.2.1 Origem e assepsia do material vegetal.....	57
5.2.2 Meio de indução e condições iniciais de cultivo <i>in vitro</i>	57
5.2.3 Regeneração do material vegetal.....	58
5.2.4 Análise estatística.....	58
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.4 CONCLUSÕES.....	64
5.5 REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é uma cultura muito importante economicamente, tendo como principais produtos a sacarose e o álcool combustível (etanol). O etanol é uma fonte de energia líquida renovável e auxilia na diminuição da poluição ambiental causada pelos combustíveis fósseis. O Brasil possui uma área cultivada aproximada de 8.167,5 mil hectares, tendo uma produção estimada em 651.514,3 mil toneladas. O Paraná é o terceiro produtor nacional, com a área de cultivo chegando a 613,67 mil hectares com 48.786,8 mil toneladas de cana moída em todo o estado (CONAB, 2010).

O consumo interno e, principalmente, o aumento das exportações impulsionaram a expansão da área nacional cultivada de cana-de-açúcar. Sendo assim, essa cultura está constantemente inserida em programas de melhoramento genético para obtenção de cultivares mais produtivos e resistentes a pragas e doenças. Porém, o melhoramento genético de cana-de-açúcar é demorado e limitado devido ao ciclo de reprodução e genética muito complexa (LANDELL et al., 1999). A engenharia genética vem como uma forma de auxiliar na introdução de genes com características desejáveis (JOYCE et al., 2010) e reduzir o tempo de obtenção de cultivares elite de cana-de-açúcar.

A cultura de tecidos *in vitro* é uma técnica que auxilia na obtenção de plantas livres de patógenos e geneticamente homogêneas. A regeneração dessas plantas *in vitro* pode ocorrer por duas vias: organogênese e embriogênese somática (TAYLOR e DUKIC, 1993; FALCO et al., 1996). Ambos podem ser induzidos direta ou indiretamente.

Na cultura da cana-de-açúcar, o método de propagação *in vitro* mais estudado para se obter plantas transgênicas é a embriogênese somática indireta, pois há formação de órgãos ou embriões a partir de calos. Esses são induzidos utilizando folhas imaturas, em meio de cultura base com adição de auxinas como Picloran e 2,4-D (HO e VASIL, 1983; LAKSHAMANA, 2006). A morfogênese pode ocorrer em meios desprovidos de reguladores de crescimento vegetal e em ambiente luminoso (FALCO et al., 1996), porém a utilização desses reguladores e ausência de luz potencializa esse processo (CHENGALRAYAN e GALLO-MEAGHER, 2005).

A cana-de-açúcar é um híbrido interespecífico, sendo que cada cultivar possui comportamento distinto, tanto a campo quanto *in vitro* (DESAI et al., 2006), desta forma, os protocolos de regeneração devem ser adaptados a cada cultivar estudado.

O presente trabalho teve como objetivo geral a obtenção de embriogênese somática de três cultivares e um clone RB de cana-de-açúcar, testando diferentes concentrações de 2,4-D, luminosidades e meios de cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é cultura economicamente importante, sendo cultivada em aproximadamente 120 países, no qual o Brasil é o maior produtor mundial (OIA, 2010). Possui como principais produtos o açúcar e o etanol (álcool combustível), sendo também matéria prima para ácido acético, butanol, papel e utilizada para alimentação animal (GARCIA et al., 2007), entre outros usos.

Segundo DANIELS e ROACH (1987), a cana-de-açúcar é uma espécie alógama, da família *Poaceae*, tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum*. O centro de origem da cana-de-açúcar é muito discutido por alguns autores, porém acredita-se que ela seja nativa da Índia e das ilhas da região da Melanésia (LEBOT, 1999; GRIVET et al., 2004; CESNIK, 2004), e se espalhou para países tropicais e subtropicais (OLIVEIRA et al., 2007). Possui um genoma complexo, com número diplóide de cromossomos variando entre 70 a 120 (D'HONT et al., 1996). É uma planta de metabolismo C_4 , com grande eficiência na conversão de energia solar em energia química. Tem um ciclo longo, o que resulta em alta produção de matéria seca. Cresce naturalmente em temperaturas acima de 25°C, porém temperatura abaixo de 21°C auxilia no acúmulo de sacarose (RODRIGUES, 1995). Possui uma inflorescência denominada de flecha e tem coloração variando com relação ao cultivar (CASAGRANDE, 1991).

É uma das culturas mais antigas cultivadas no Brasil e foi introduzida por Martim Afonso de Souza, na primeira metade do século XVI (PEDROZO, 2006). Segundo MATSUOKA et al. (1999) o melhoramento genético da espécie no Brasil

teve início juntamente com a exploração comercial da cultura. Os cultivares utilizados atualmente são cruzamentos interespecíficos entre *Saccharum officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. spontaneum* e *S. robustum*.

O melhoramento tradicional possui restrições para o desenvolvimento de novos cultivares com elevada produtividade e inserção de características de interesse agrônomo, como tolerância a patógenos e pragas, e elevação no teor de sacarose (LAKSHMANAN, 2006; JOYCE et al., 2010). Além disso, o tempo de obtenção de novos cultivares e o descarte de materiais promissores, por apresentarem algum tipo de suscetibilidade a doenças ou patógenos (ROACH, 1995), tornam a cultura uma candidata em potencial para a transformação genética.

2.2 Cultura de Tecidos

Esta técnica compreende o cultivo de plantas em condições assépticas, nutrição, temperatura, umidade e luminosidade controladas (PEREIRA, 2003; RODRIGUES, 2005). A multiplicação de tecidos organizados *in vitro* pode ser realizada com diversos tipos de explantes, como por exemplo, as culturas de anteras, protoplastos, meristemas, organogênese e embriogênese somática direta e indireta (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Meios de cultura utilizados para o cultivo *in vitro* fornecem substâncias essenciais para o desenvolvimento e crescimento dos tecidos (CALDAS et al., 1998). Estes são compostos por macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, sacarose, água, presença ou ausência de agente geleificante (ágar, fitagel, etc.) e fitorreguladores. Existem diferentes meios de cultura, cada um adaptado à determinada espécie de planta ou a obtenção de diferentes resultados (GUERRA e

NODARI, 2006). Além dos componentes do meio de cultura, a regeneração de plantas *in vitro* pode ser influenciada também por fatores externos (condições ambientais) e por fatores inerentes ao material vegetal (hereditariedade, estado fisiológico do explante e da planta que lhe deu origem) (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

2.2.1 Embriogênese Somática

A embriogênese somática foi estudada pela primeira vez há aproximadamente 50 anos por Steward et al. (1958) e Reinert (1959) e continua sendo objeto de estudo, devido a sua grande importância. É dividida em indução e expressão, onde a indução ocorre por meio de reguladores de crescimento vegetal acrescentados ao meio de cultura, bem como as auxinas sintéticas; e a expressão é a fase em que as células mostram sua competência em se diferenciar em embriões somáticos (JIMÉNEZ, 2005).

A embriogênese somática pode ser descrita como o processo em que células diplóides ou somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, passando por estágios característicos embriogênicos, sem fusão de gametas. Este processo ocorre naturalmente em *Citrus* spp. e em coníferas, onde os embriões são idênticos a planta-mãe, perpetuando a população de clones via semente (LITZ e GRAY, 1995).

Células somáticas, em diferentes estágios de desenvolvimento, podem ser induzidas *in vitro* para novas competências morfogênicas (FITCH e MOORE, 1990; LITZ e GRAY, 1995; HEERDT, 2008). A cana-de-açúcar foi uma das primeiras espécies vegetais a ser regenerada *in vitro* com sucesso (BARBA e NIKELL, 1969;

HEINZ e MEE, 1969). Desde então, muitos estudos tem sido realizados em cana-de-açúcar, principalmente para obtenção da embriogênese somática (LIMA et al., 2001; GANDONOU et al., 2005; LAKSHMANAN et al., 2006; JOYCE et al., 2010). Infelizmente há muita variação somaclonal, causando anormalidades morfológicas (LOURENS e MATIN, 1987; BURNER e GHISHAM, 1995; JOYCE et al., 2010).

A indução de calos em cana-de-açúcar ocorre tradicionalmente em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (BRISIBE et al., 1994; BLANCO et al., 1997; SUPRASANNA et al., 2008; WATT et al., 2009; JOYCE et al., 2010). Diferenças na indução de calos embriogênicos são observadas com relação ao regulador de crescimento utilizado. As auxinas sintéticas mais comumente utilizadas 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-metoxibenxóico (Dicamba) (BRISIBE et al., 1994; KHAN et al., 2008) e o ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (BLANCO et al., 1997; GANDONOU et al., 2005; WATT et al., 2009) as mais utilizadas para cultura de cana-de-açúcar.

Em cana-de-açúcar, os explantes para a formação de calos embriogênicos são retirados de folhas jovens, próximos ao meristema (TAYLOR et al., 1993; LAKSHIMANAN et al., 2006; MOLINARI, 2006; GARCIA et al., 2007; JOYCE et al., 2010), que possuam de 6 a 15 meses (MARCANO et al., 2002; GILL et al., 2006). Alguns pesquisadores afirmam que a utilização de sementes (CHENGALRAYAN e GALLO-MEAGHER, 2005) e palmitos com formação de inflorescência, são fontes de eficientes de explantes para a obtenção de calos embriogênicos (DESAI et al., 2004; SNYMAN et al., 2006), e maior regeneração de plântulas (BLANCO et al., 1997; GILL et al., 2006). FRANKLIN et al. (2006), utilizando segmentos da bainha de folhas de cana-de-açúcar, conseguiram calos embriogênicos e plântulas.

2.2.2 Fatores que influenciam a embriogênese somática de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é um híbrido interespecífico, desta forma, cada cultivar possui comportamento distinto, tanto no campo quanto *in vitro*, onde a resposta morfogênética é muito influenciada pelo genótipo. LIMA et al. (2001) relatam que alguns cultivares apresentam elevada formação de calos mucilaginosos sem formação de plântulas, enquanto outros possuem grande capacidade de formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas. GANDONOU et al. (2005) comparando a resposta de nove genótipos em meio MS com 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D, observou diferenças significativas entre esses como, por exemplo, a capacidade de indução e regeneração de plantas, indicando que esses critérios são dependentes do genótipo. Os genótipos estudados são os mais variados, e as pesquisas são realizadas com os cultivares adaptados a cada região de cultivo e exploração econômica.

Outro fator de influência é a intensidade luminosa que pode promover resposta positiva na obtenção de calos embriogênicos para algumas espécies (GARCIA et al., 2007), como o *Ranunculus sceleratus* que mostrou taxas de formação de massas calosas iguais tanto para ambiente claro como escuro (KONAR e NATARAJA, 1969). Para a cultura da cana-de-açúcar, a embriogênese somática ocorre no escuro (GANDONOU et al. 2005; LAKSHAMANAN, 2006; JOYCE et al., 2010), pois há maiores taxas de formação de calos nesse ambiente, em comparação com locais sob intensidade luminosa (GARCIA et al., 2007).

A temperatura também possui influencia sob a formação de calos embriogênicos de cana-de-açúcar. Segundo ALI et al. (2008) a indução e proliferação desses calos ocorreram em temperatura aproximada de 27°C ± 1°C.

Esses dois fatores, temperatura e luminosidade, são pouco estudados, apesar de influenciarem na embriogênese somática de cana-de-açúcar (KAMADA et al., 1995; HUTCHINSON et al., 2000; GARCIA et al., 2007).

A utilização da auxina 2,4-D no meio de cultura induz a formação de calos e apresenta uma resposta favorável na obtenção de calos embriogênicos. PASTERNAK et al. (2002) relatam que o 2,4-D aumenta os níveis de auxina endógena nos explantes responsivos e por esse motivo é mais eficiente na resposta indutiva dos tecidos. Porém, a manutenção prolongada dos embriões neste regulador e repetidos subcultivos, podem causar instabilidade genética (GILL et al., 2006) e aumentar a probabilidade de variação somaclonal (BURNER e GRISHAM, 1995; FRANKLIN et al., 2006; LAKSHIMANAN et al., 2006), afetando o potencial embriogênico em cana-de-açúcar.

2.2.3 Cana-de-açúcar transgênica

Existem diversas técnicas de transformação genética alocadas em dois grupos distintos: transformação indireta e direta de plantas. A transformação indireta utiliza um vetor biológico, como a *Agrobacterium tumefaciens* e *rhizogenes*, para carrear o DNA exógeno de interesse para o genoma (CHILTON et al., 1977; CHILTON et al., 1982; LIMA et al., 2001). A transformação direta é baseada em métodos físicos ou químicos, destacando-se a eletroporação, transformação com polietilenoglicol (PEG) e aceleração de partículas ou também conhecida como biobalística (GARCIA et al., 2007). A biobalística consiste na aceleração de partículas de ouro ou tungstênio, revestidos de DNA, e carreadas para o interior da célula a ser transformada (FERREIRA et al., 2004).

As primeiras plantas geneticamente transformadas de cana-de-açúcar foram conseguidas através da biobalística por Bower e Birch em 1992, utilizando o gene *nptII* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II. Esta confere resistência a canamicina e geneticina (MOLINARI et al., 2007). Nos últimos anos, muitos trabalhos foram realizados para a obtenção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar conferindo resistência a herbicidas (GALLO-MEAGER e IRVINE, 1996; FALCO et al., 2000; MANICKAVASAGAM et al., 2004), insetos (ARENCEBIA et al., 1997), vírus do mosaico (INGELBRECHT et al., 1999; BUTTERFIELD et al., 2002) e estresse hídrico (ZHANG et al., 1999; MOLINARI et al., 2007).

Protocolos de indução e regeneração de plantas bem definidos e otimizados são muito importantes para a transformação genética de cana-de-açúcar. Sendo essa cultura um híbrido interespecífico, que possui respostas distintas de formação de calos embriogênicos para cada cultivar, os protocolos devem ser adaptados para cada um desses individualmente (GARCIA et al., 2007).

A cana-de-açúcar apresenta características que possibilitam a transformação genética, como por exemplo, a facilidade de regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos (LAKSHMANAN, 2006) e a multiplicação em escala comercial pela propagação *in vitro* (GALLO-MEAGHER e IRVINE, 1996). Porém, alguns pesquisadores relatam que há dificuldades na obtenção de células e tecidos transformados de cana-de-açúcar (CHOWDHURY e VASIL, 1993; GONZÁLES-CABRERA et al., 1998; ELLIOT et al., 1998; PEDRO et al., 2001). Devido ao fato que os métodos usuais de transferência de genes resultam em uma baixa eficiência na obtenção de células transformadas, com reduzida sobrevivência celular, e a integração do DNA e regeneração das plantas são limitadas.

Outro fator problemático na transformação dessa espécie é que o método de biobalística possui uma complexidade de integração, inserindo múltiplas cópias do gene de interesse, resultando em problemas futuros com a instabilidade do transgene ou silenciamento gênico (LESSARD et al., 2002; MOLINARI et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- ALI, A.; NAZ, S.; SIDDIQUI, F.A.; IQBAL, J. Rapid clonal multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum*) through callogenesis and organogenesis. **Pakistan Journal of Botanic**. 40(1):123-138, 2008.
- ARENCIBIA, A.; VAZQUEZ, R.; PIETRO, D.; TELLEZ, P.; CARMONA, E.; COEGO, A.; HERNANDEZ, L.; DE LA RIVA, G.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stemborer attack. **Molecular Breeding**, 3:247-255, 1997.
- BARBA, R.; NICKELL, L.G. Nutrition and organ differentiation in tissue culture of sugarcane – a monocotyledon. **Planta**, 89:299-302, 1969.
- 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**, 51:153-158, 1997.
- BRISIBE, E.A., MIYAKE, H., TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Regulation of somatic embryogenesis in long-term callus cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **New Phytologist**, 126:301-307, 1994.
- BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**. Oxford, 2(3):409-416, 1992.
- BURNER, M.D.; GRISHAM, M.P. Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane as affected by propagation procedure. **Crop Science**, 35:875-880, 1995.
- 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**, 104:797-803, 2002.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**, Brasília. 87:132, 1998.
- CASAGRANDE, A.A. Tópicos de morfologia e fisiologia da cana -de-açúcar. Jaboticabal: **FUNEP**, p.157, 1991.
- CESNIK, R. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, p. 307, 2004
- CHENGALRAYAN, A. A.; GALLO-MEAGHER, A. In Vitro regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 41:477-482, 2005.
- CHILTON, M.D.; DRUMMOND, M.H.; MERLO, D.J.; SCIAKY, D.; MONTOYA, A.L.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, 11:263-271, 1977.

CHILTON, M.D.; TEPFER, D.A.; PETIT, A.; DAVID, C.; CASSE-DELBART, F.; TEMPÉ, J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into genomes of the host-plant root cells. **Nature**, 295:432-434, 1982.

CHOWDHURY, M.K.U.; VASIL, I. Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of hybrid sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.). **Theoretical Applied Genetics**. 86:181-188, 1993.

CONAB. Cana-de-Açúcar. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/boletim_cana_setembro_2010.pdf Arquivo consultado em 15/10/2010.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. New York: Elsevier, p.7-84, 1987.

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**, 87:764-768, 2004.

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

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular Genetics and Genomics**, 25:405-413, 1996.

ELLIOT, A.R.; CAMPBELL, J.A.; BRETTEL, R.I.S.; GROF, C.P.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Australian Journal Plant Physiology**, 25:739-743, 1998.

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**, 9:93-97, 1996.

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, 19:118-1194, 2000.

FERREIRA, M.G.R.; CARVALHO, C.H.S.; CARNEIRO, A.A.; CÁRDENAS, F.E.N. Introdução de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schumm.) usando biobalística. **Ciência Rural**, Santa Maria, 34(1):279-280, 2004.

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**, 20:157-163, 1990.

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**, 50:111-119, 2006.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene. **Crop Science**, 36:37-40, 1996.

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**, 4(11):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**, 90:181-190, 2007.

GILL, R.; MALHTRA, P.K.; GOSAL, S.S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 84:227-231, 2006.

GONZÁLEZ-CABRERA, J.; COEGO-GONZÁLEZ, A.; MARTINES-GIL, A.F.; DE LA RIVA, G.A.; VAZQUEZ-PADRON, R.I. Otimization of transgene expression in sugarcane cells. **Biotechnology Techniques**, 12:793-796, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPq, p. 99-169, 1990.

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**, 2:9-17, 2004.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Apostila de Biotecnologia. CCA/UFSC. Edição da Steinmacher. p.41, 2006.

HEERDT, E. Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). **Universidade Federal de Viçosa**. MG. p.40, 2008.

HEINZ, D.J.; MEE, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* spp. **Crop Science**, 9:346-348, 1969.

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

HUTCHINSON, M.J.; SENARATNA, T.; SAHI, S.V.; SAXENA, P.K. Light mediates endogenous plant growth substances in thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium hypocotyls culture. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 9:1-6, 2000.

INGELBRECHT, I.L.; IRVINE, J.E.; MIRKOV, T.E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploidy genome. **Plant Physiology**, Rockville, 119(4):1187-1198, 1999.

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

JOYCE, P.; KUWAHATA, M.; TURNER, N.; LAKSHMANAN, P. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. **Plant Cell Reports**, 29:173-183, 2010.

KAMADA, H.; TACHIKAWA, Y.; SAITOU, T.; HARADA, H. Effects of light and growth regulators on adventitious bud formation in horderadish (*Armoracia rusticana*). **Plant Cell Reports**, 14:611-615, 1995.

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

KHONAR, R.N.; NAKARAJA, K. Morphogenesis of isolated floral buds of *Ranunculus scelerantus* L. *in vitro*. **Acta Botanica**, 18:680-699, 1969.

LANDELL, M.G.A.; ALVAREZ, R.; ZIMBACK, L.; CAMPANA, M.P.; SILVA, M.A.; PEREIRA, J.C.V.N.A.; PERECIN, D.; GALLO, P.B.; MARTINS, A.L.M.; KANTHACK, R.A.D.; FIGUEIREDO, P.; VASCONCELOS, A.C.M. Avaliação final de clones IAC de cana-de-açúcar da série 1982, em latossolo roxo da região de Ribeirão Preto. **Bragantia**, Campinas, 58(2):269-280, 1999.

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

LAKSHMANAN, P. Invited review addendum: somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review ‘sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities’. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 41(4):345–363, 2006.

LEBOT, V. Biomolecular evidence for plant domestication in Sahul. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 46:619-628, 1999.

LESSARD, P.A.; KULAVEERASINGAM, H.; YORK, G.M.; STRONG, A.; SINSKEY, A.J. Manipulation gene expression for the metabolic engineering of plants. **Metabolic Engineering**, 4:67-79, 2002.

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, 24(1):73-77, 2001.

LITZ, R.E.; GRAY, D.J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 11:416-425, 1995.

LOURENS, A.G.; MARTIN, F.A. Evaluation of *in vitro* propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation. **Crop Science**, 27:793-796, 1987.

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**, 23(3):134-143, 2004.

MARCANO, A.K.; PEDRO, M.G.; OROPEZA, M.; GARCIA, E. Otimización del proceso de embriogénesis somática em variedades venezolanas de caña de azúcar. **Acta Científica Venezolana**, 53: 251-257, 2002.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. Melhoramento de cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. Ed. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2:205-251, 1999.

MOLINARI, H.B.C. Expressão estresse-induzida do gene P5CS em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico. Tese (Doutorado em Agronomia com Ênfase em Produção Vegetal). **Universidade Federal do Paraná**. PR. p.124, 2006.

MOLINARI, H.B.C.; MARUR, C.J.; DAROS, E.; CAMPOS, M.K.F.; CARVALHO, J.F.R.P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**. 130 (2):218-229, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15:473-479, 1962.

OIA [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://isosugar.org/> Arquivo consultado em 10/12/2010.

OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R.; MARCONI, T.G.; MARGARIDO, G.R.A.; PASTINA, M.M.; TEIXEIRA, L.H.M.; FIGUEIRA, A.V.; ULIAN, E.C.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Functional integrated genetic linkage map based on EST-markers for a sugarcane (*Saccharum* spp.) comercial cross. **Molecular Breeding**, 20:189-208, 2007.

PASTERNAK T.; FEHÉR A.; ÖTVÖS K.; MISKOLCZI P.; DUDITS D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia** (Bratislava) 57: 5-12, 2002.

PEDRO, M.G.; MARCANO, A.K.; OROPEZA, M. Parametrization for genetic transformation of cellular suspensions of the sugarcane cultivar V78-1 (*Saccharum* sp.) by eletroporation. **Phyton – International Journal Experimental Botany**, 1:57-65, 2001.

PEDROZO, A. Eficiência da seleção em fases iniciais no melhoramento da cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2006.

PEREIRA, J.E.S.; MATTOS, M.L.; FORTES, G.R.L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38:1-13, 2003.

ROACH, B.T. Case for a core collection of sugarcane germplasm. Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists, 21:339-350, 1995.

RODRIGUES, J.D. (1995) Fisiologia da cana-de-açúcar. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: http://www.canabrasil.com.br/component/option,com_docman/task,doc_view/gid,92/ consultado em 05/01/2011.

RODRIGUES, P.H.V. *In vitro* establishment of *Heliconia raulianiana* (Heliconiaceae). **Scientia Agricola**, 62:1-6, 2005.

REINERT and J. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. **Ber. Deutsch. Bot. Ges.** 71: 15, 1959.

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

STEWART F.C.; MAPES M.O.; MEARS K. Growth and organized development of cultured cells. II: organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, 45:705-708, 1958.

SUPRASANNA, P.; RUPALI, C.; DESAI, N.S.; BAPAT, V.A. Partial desiccation augments plant regeneration from irradiated embryogenic cultures of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 92:101-105, 2008.

TAYLOR, P.W.J.; DUKIC, S. Developmental of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum* spp. Hybrid germoplasm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 34:217-222, 1993.

WATT, M.P.; BANASIAK, M.; REDDY, D.; ALBERTSE, E.H.; SNYMAN, S.J. *In vitro* minimal growth storage of *Saccharum* spp. hybrid (genotype 88H0019) at two stages of direct somatic embryogenic regeneration. **Plant Cell Tissue And Organ Culture**. 96, 3:263-271, 2009.

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

3 CAPÍTULO I: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CULTIVAR RB966928 E DO CLONE RB986419 DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*)

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura plantada mundialmente devido a sua grande importância econômica, provenientes de seus produtos (etanol e açúcar). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar, sendo assim a cultura está frequentemente inserida em programas de melhoramento genético. A transformação genética é uma importante ferramenta para se obter cultivares mais resistentes a estresses bióticos e abióticos. Para obtenção plantas transgênicas são necessários protocolos definidos e otimizados de regeneração *in vitro*. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de 2,4-D na obtenção de calos embriogênicos no cultivar RB966928 e clone RB986419. Folhas imaturas, com 10 meses de idade, foram utilizadas como fonte de explantes e desinfestados com água deionizada estéril, álcool e hipoclorito. Cilindros foliares de 8 x 150 mm, segmentado em 4 mm, foram inoculados em meio de cultura MS com cinco concentrações de 2,4-D (1, 3, 9, 16 e 27 μM). Um segundo experimento foi realizado com as concentrações de 3, 9 e 16 μM de 2,4-D. Para os dois experimentos, a desdiferenciação do material ocorreu no escuro. Os calos foram transferidos após 45 dias de subcultivo para novo meio de cultura, com as mesmas concentrações de origem para sua multiplicação. O clone RB986419 apresentou respectivamente 26 e 80% de formação de calos embriogênicos, utilizando-se 9 μM de 2,4-D para os dois experimentos. O cultivar RB966928 teve respostas de embriogênese somática de 30 e 41% utilizando 16 μM de 2,4-D para o primeiro e segundo experimentos respectivamente. Houve o desenvolvimento de brotações precoces e raízes nos calos formados em meio de cultura suplementado com 3 μM . Os calos formados foram transferidos para meio de regeneração. As plântulas desenvolvidas foram aclimatizadas e colocadas em casa de vegetação. As melhores concentrações de 2,4-D para a formação de calos embriogênicos foram 9 μM para o clone RB986419 e 16 μM para o cultivar RB966928.

Palavras-chave: calos embriogênicos, 2,4-D, transformação genética.

3 CHAPTER I: SOMATIC EMBRYOGENESIS OF CULTIVAR RB966928 AND RB986419 CLONE OF SUGARCANE (*Saccharum* spp.)

ABSTRACT

Sugarcane is a worldwide cultivated crop due its great economic importance, from its products (ethanol and sugar). Brazil is the most important producer and exporter of sugar in the world. For this reason this crop is frequently inserted in breeding programs. The genetic transformation is an important tool to obtain cultivars more resistant to biotic and abiotic stress. For the achievement of transgenic plants is necessary defined and optimized protocols of *in vitro* regeneration. The goal of the present work was to evaluate the influence of the different concentrations of 2,4-D in the achieve of embryogenic callus of the RB966928 cultivar and of the clone RB986419. Immature leaf with 10 months old were used as source of explants. The leaves were disinfected with sterile water, alcohol and hypochlorite. Leaf cylinders with 8 x 150 mm, sliced in 4 mm, were inoculated in MS with five concentrations of 2,4-D (1, 3, 9, 16 and 27 μM). A second experiment was made with the concentrations of 3, 9 and 16 μM of 2,4-D. For the two experiments the differentiation process occurred on the darkness. After 45 days of subculture, the calluses were transferred to a new media with the same concentrations of the previous media. The RB986419 clone presented 26 and 60% of embryogenic callus formation at 9 μM of concentration of 2,4-D for the two experiments respectively. The RB966928 cultivar had 30 and 40% of response of somatic embryogenesis in the concentration of 16 μM of 2,4-D for the first and second experiment respectively. There were premature shoot and root development in the callus cultivated on media with 3 μM of 2,4-D. the callus obtained were transferred for the regeneration media. The plants obtained was acclimatized and placed in a greenhouse. The best concentrations of 2,4-D were 9 μM for the RB986419 clone and 16 μM for the RB966928 cultivar.

Keywords: Embryogenic callus, 2,4-D, genetic transformation.

3.1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de regiões tropicais e subtropicais e está entre as culturas mais plantadas no mundo, devido aos seus principais produtos: o açúcar e o etanol (álcool combustível). O Brasil é o maior produtor e exportador de açúcar, possuindo na safra 2009/2010 uma área plantada aproximada de 8.167,5 mil hectares. O Paraná é o terceiro maior estado produtor de cana-de-açúcar, atrás de São Paulo e Minas Gerais, com a área de 613,67 mil hectares (CONAB, 2010).

Programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar visam a obtenção de plantas com elevada produtividade e resistentes a estresses bióticos e abióticos (GARCIA et al., 2007). Com isso, alguns clones e cultivares se destacam no campo. Entre eles estão o clone RB986419, que possui maturação de meio de safra, é tido como um clone promissor, pois possui elevada produtividade e riqueza agrícola, e está em fase de testes pela UFPR, se destacando pelo elevado teor de açúcar (RIDESA, 2009). O cultivar RB966928, que foi lançado em 2010 pela UFPR, possui ciclo de maturação precoce e elevada sanidade às principais doenças, excelente brotação e adaptabilidade fenotípica, e vem sendo muito plantado nos estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul (RIDESA 2010).

A transformação genética vem como uma ferramenta para se obter cultivares mais resistentes e produtivos em um curto espaço de tempo. Para isso, são necessários protocolos bem definidos e otimizados de regeneração *in vitro* de plantas (DESAI et al, 2004). Na cana-de-açúcar a resposta morfogênica é fortemente influenciada pelo genótipo, conseqüentemente é necessário que os protocolos sejam adaptados para cada cultivar.

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica de cultivo que utiliza explantes, como ápices caulinares, meristemas, gemas laterais e/ou axilares, para a indução de novos órgãos ou plantas inteiras. Em cana-de-açúcar, a regeneração de plantas via cultura de tecidos pode ocorrer de duas formas: organogênese ou embriogênese somática, podendo ser direta, onde há formação de calos, e indireta, que não forma calos. Para a cana-de-açúcar, a forma mais estudada e utilizada é a embriogênese somática (LAKSHMANAN, 2006).

Embriogênese somática é um termo usualmente empregado para denominar o processo pelo qual, células haplóides ou somáticas, se desenvolvem por diferentes estágios embriogênicos, sem a fusão de gametas (WILLIAMS e MEHESWARAN, 1986; GUERRA et al., 1999). Esse processo pode ocorrer de forma direta ou indireta, conforme a idade fisiológica ou tipo de explante utilizado (GUERRA et al., 1999; GUERRA e NODARI, 2006).

Em cana-de-açúcar, a indução da embriogênese somática é realizada com o uso de reguladores de crescimento vegetal, mais precisamente as auxinas, como o ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinecarboxílico (Picloram) (GANDONOU et al., 2005). Estes estão envolvidos na reprogramação epigenética, ou seja, favorecem a ativação de determinados genes e a desativação de outros, que poderá diferenciar ou desdiferenciar as células (JIMÉNEZ, 2005). O 2,4-D é o regulador mais utilizado para o desenvolvimento de embriões somáticos em cana-de-açúcar (HO e VASIL, 1983; GALLO-MEAGHER, 2000; DESAI et al., 2004), pois é superior se comparado a outros reguladores de crescimento vegetal utilizados para esse fim (LAKSHMANAN, 2006).

Objetivou-se avaliar a influência de diferentes concentrações de 2,4-D na obtenção de calos embriogênicos no cultivar RB966928 e no clone RB986419.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de realização, origem do material e assepsia

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Micropropagação de Plantas, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Foram utilizados como explantes folhas imaturas (palmitos) do clone RB986419 e do cultivar RB966928 de cana-de-açúcar. Ambos com aproximadamente, 10 meses de idade e, provenientes da Estação Experimental de Paranaíba, no município de Paranaíba, estado do Paraná.

O experimento foi realizado em duas etapas. Para o primeiro teste, os palmitos foram colhidos em outubro de 2009 para ambos os genótipos. O segundo experimento foi realizado com material vegetal retirado do campo no mês de fevereiro (RB986419) e maio de 2010 (RB966928).

Foram retiradas as folhas externas e a ponteira para a obtenção dos cilindros iniciais, de aproximadamente 10 mm de diâmetro e 200 mm de comprimento. A desinfestação dos palmitos foi realizada em câmara de fluxo vertical, com três lavagens com água deionizada estéril, um min em álcool 70%, 20 min em hipoclorito de sódio a 2% com duas gotas de detergente neutro líquido e mais três lavagens de água deionizada estéril. As pontas e folhas externas foram retiradas, permanecendo um cilindro interno de 8 X 150 mm. Os explantes foram padronizados com aproximadamente 8 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento.

3.2.2 Meio de indução e condições de cultura *in vitro*

No primeiro experimento, o meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com cinco concentrações da auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D): 1, 3, 9, 16 e 27 μM . Para o segundo experimento, utilizou-se o meio MS com as concentrações de 3, 9 e 16 μM de 2,4-D. Todos os meios foram suplementados com 30 g.L^{-1} de sacarose, 7 g.L^{-1} de ágar e o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C, 1,5 atm por 20 min.

Foram utilizados frascos com capacidade para 200 mL, com tampa de polipropileno, contendo 50 mL de meio de cultura em cada frasco. Para cada concentração de 2,4-D foram utilizados 10 frascos, com 5 explantes. Os experimentos foram colocados em sala de crescimento, no escuro, com temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por 40 dias para primeiro experimento e 30 dias para o segundo.

A cada 10 dias, foram avaliados a formação de calos embriogênicos, calos não embriogênicos e a oxidação dos explantes. Os calos embriogênicos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura MS, com a mesma concentração que lhe deu origem. Os calos foram mantidos na ausência de luz por 30 dias, para aumentar a proliferação das massas embriogênicas e a eliminação dos calos não embriogênicos.

3.2.3 Regeneração do material vegetal

Após os 30 dias em placas de Petri, os calos embriogênicos que não oxidaram foram transferidos para frascos com capacidade de 200 mL com tampa de polipropileno, contendo 50 mL de meio de cultura MS, desprovidos de reguladores

de crescimento vegetal. O material foi colocado em sala de crescimento, em luminosidade de $57 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, medido com luxímetro FLUKE 5500A. O fotoperíodo foi de 16 horas, e a temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.4 Aclimatização do material regenerado

As plântulas foram retiradas dos meios de cultura, separadas em câmara de fluxo vertical e colocadas em bandeja com água deionizada estéril para evitar a perda de água. As raízes foram lavadas para retirar o excedente de meio de cultura e colocadas em bandeja de alumínio, com 100 mL de água deionizada, sendo vedada com saco plástico transparente para manter a umidade das plântulas. Estas foram colocadas sob as mesmas condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo citados anteriormente, permanecendo por 15 dias.

Após esse período, as plântulas foram transferidas para tubetes de polipropileno preto, de 125 x 34 mm, contendo substrato comercial Plantmax HT[®], sendo mantidas em casa de vegetação climatizada com nebulização duas vezes ao dia durante 15 min, temperatura variando entre 28 a 35°C e UR 60%. Aos 30 e 60 dias, as plântulas receberam suplementação da solução líquida do meio MS, contendo os macro e micronutrientes e as vitaminas, para auxiliar na sua nutrição e desenvolvimento. Aos 90 dias, as plântulas foram transferidas para sacos de polipropileno, medindo 160 x 220 mm, contendo o mesmo substrato citado anteriormente.

3.2.3 Análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e a homogeneidade dos dados foi analisada pelo teste de Bartlett. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foi utilizando o programa computacional MSTAT (versão 2.1 – Michigan State University, 1995).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Clone RB986419

Explantos de folhas imaturas de cana-de-açúcar, clone RB986419, originaram 26% de calos embriogênicos quando cultivados em meio MS suplementado com 9 μM de 2,4-D (Tabela 1). Esses calos tinham um aspecto compacto, amarelado e nodular (Figura 1A e 1B) e de fácil separação, de forma semelhante às descritas por ARENCIBIA et al. (1995) e LIMA et al. (2001). A utilização de reguladores vegetais em meio de cultura, como o 2,4-D, é fundamental na embriogênese somática de cana-de-açúcar, pois influencia na obtenção de embriões somáticos e na regeneração das plântulas (LAKSHMANAN, 2006; DE VITA, 2008).

A dediferenciação dos explantes foi observada a partir do 5º dia após a implantação do experimento, em todos os meios de indução e a formação de calos não embriogênicos ocorreu, visualmente, após 15 dias de cultivo *in vitro*. Os tratamentos de 1, 3, 9 e 27 μM de 2,4-D, não diferiram estatisticamente (Tabela 1). Entretanto, meio MS acrescido de 1 μM , formou uma elevada quantidade de calos (60%), porém esses tinham um aspecto mucilaginoso, que segundo a literatura não originam calos embriogênicos (ARENCIBIA et al., 1995; LIMA et al., 2001; GARCIA et al., 2007) e plântulas (GARCIA et al., 2007). HO e VASIL (1983) relatam que o 2,4-D, utilizado em altas concentrações no meio de cultura, acarreta na formação desses calos mucilaginosos e que, para o desenvolvimento de calos embriogênicos, o material deve permanecer por um tempo maior *in vitro*.

TABELA 1. Efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos, em explantes de cana-de-açúcar, clone RB986419, após 40 dias de cultura.

Concentração de 2,4-D (μM)	% Explantes		
	Calos Embriogênicos	Calos	Oxidados
1	0 c	60 a	80 a
3	4 b	34 ab	94 a
9	26 a	48 ab	74 a
16	10 b	22 b	80 a
27	0 c	28 ab	96 a
C.V. (%)	50,2	20,1	27,6

Médias seguidas de letras idênticas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Os explantes desse clone apresentaram elevada porcentagem de oxidação, não demonstrando diferença significativa para essa variável. Em alguns frascos, foi observada a necrose dos explantes. Porém, na maioria dos casos, essa oxidação ocorreu somente na folha externa do explante, com coloração variando do marrom claro ao escuro, permanecendo o centro deste com uma cor amarelada ou bege, apresentando formação de massas calosas. A oxidação de explantes pode ser ocasionada pelos componentes do meio de cultura como o ferro, cobre e zinco (UTINO et al., 2001). No meio MS as concentrações desses micronutrientes é elevada, se comparada com outros meios de cultura, como o WPM (NUNES et al., 2002).

A transferência das massas calosas formadas no meio de indução inicial para o mesmo meio de cultura e concentração de 2,4-D, em placas de Petri, resultaram em um desenvolvimento de calos embriogênicos e regeneração precoce de brotações no tratamento de 9 μM (Figura 1C). Após 20 dias nesse meio de cultura, as massas de calos oxidaram e houve perda de todo material, sem desenvolvimento de novas plântulas. As brotações que foram transferidas para meio de regeneração não se desenvolveram, o que condiz com o relato de JIMÉNEZ (2005) de que

massas celulares que possuem maturação precoce levam a plântulas pouco desenvolvidas e com dificuldade de se converter em plantas normais.

TABELA 2. Efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos, em explantes de RB986419, de cana-de-açúcar, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Concentração de 2,4-D (μM)	% Explantes		
	Calos Embriogênicos	Calos	Oxidados
3	28 b	34 b	98 a
9	80 a	66 a	54 b
16	20 b	40 b	88 a
C.V. (%)	65,7	63,1	23,8

Médias seguidas de letras idênticas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Para o segundo experimento, a maior porcentagem de calos embriogênicos obtida foi de 80%, utilizando-se 9 μM de 2,4-D, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 2). Essa indução de calos embriogênicos foi mais rápida, aproximadamente duas semanas antes do que a observada no primeiro experimento, para todos os tratamentos testados.

Vários estudos, com diferentes genótipos de cana-de-açúcar, mostram que as respostas do material vegetal *in vitro* são distintos (CIDADE et al., 2006), sendo esse um fator de grande influência na obtenção de material micropropagado. Porém, outros fatores que determinam as diferentes porcentagens de formação das massas calosas é a idade fisiológica do material a campo e a posição de retirada dos explantes da planta matriz (HO e VASIL, 1983), indicando que o resultado observado para calos embriogênicos ocorreu pela diferença na época em que o material foi retirado do campo.

Houve uma redução na taxa oxidativa dos explantes, 54% para a concentração de 9 μM de 2,4-D, com elevada porcentagem, 66%, de formação de calos não embriogênicos (Tabela 2).

Foi observado a formação de raízes em calos induzidos em meios de cultura em concentração de 3 μM de 2,4-D. Isso se deve pela provável falta de citocininas no meio de cultura e concentrações elevadas de auxina presentes explante somado com as auxinas no meio nutritivo, influenciando diretamente os processos fisiológicos e bioquímicos do material *in vitro* (SILVEIRA et al., 2006; DIAS et al., 2009), desenvolvendo raízes ao invés de proliferar calos embriogênicos.

Os calos embriogênicos colocados em meio de regeneração desenvolveram brotações após 15 dias. Essas brotações alongaram e formaram raízes aos 46 dias de cultivo *in vitro*. Dos 80% de calos embriogênicos formados na concentração de 9 μM de 2,4-D (Tabela 2), apenas 28% desenvolveram plântulas no clone RB986419 e foram aclimatizadas. Não houve o desenvolvimento de plântulas nos demais tratamentos. A aclimatização realizada foi eficiente, não ocasionando perda de nenhuma planta durante o processo. Não foram observadas diferenças fenotípicas nas plantas após o desenvolvimento *ex vitro* e permanência em casa de vegetação.

3.3.2 Cultivar RB966928

A formação de calos embriogênicos, para o cultivar RB966928, ocorreu utilizando as concentrações de 9, 16 e 27 μM de 2,4-D, onde 24, 30 e 18% dos explantes formaram calos embriogênicos (Tabela 3). Os primórdios desses calos, de coloração amarelada e compactos (Figura 2B), foram visíveis 20 dias após a indução *in vitro*.

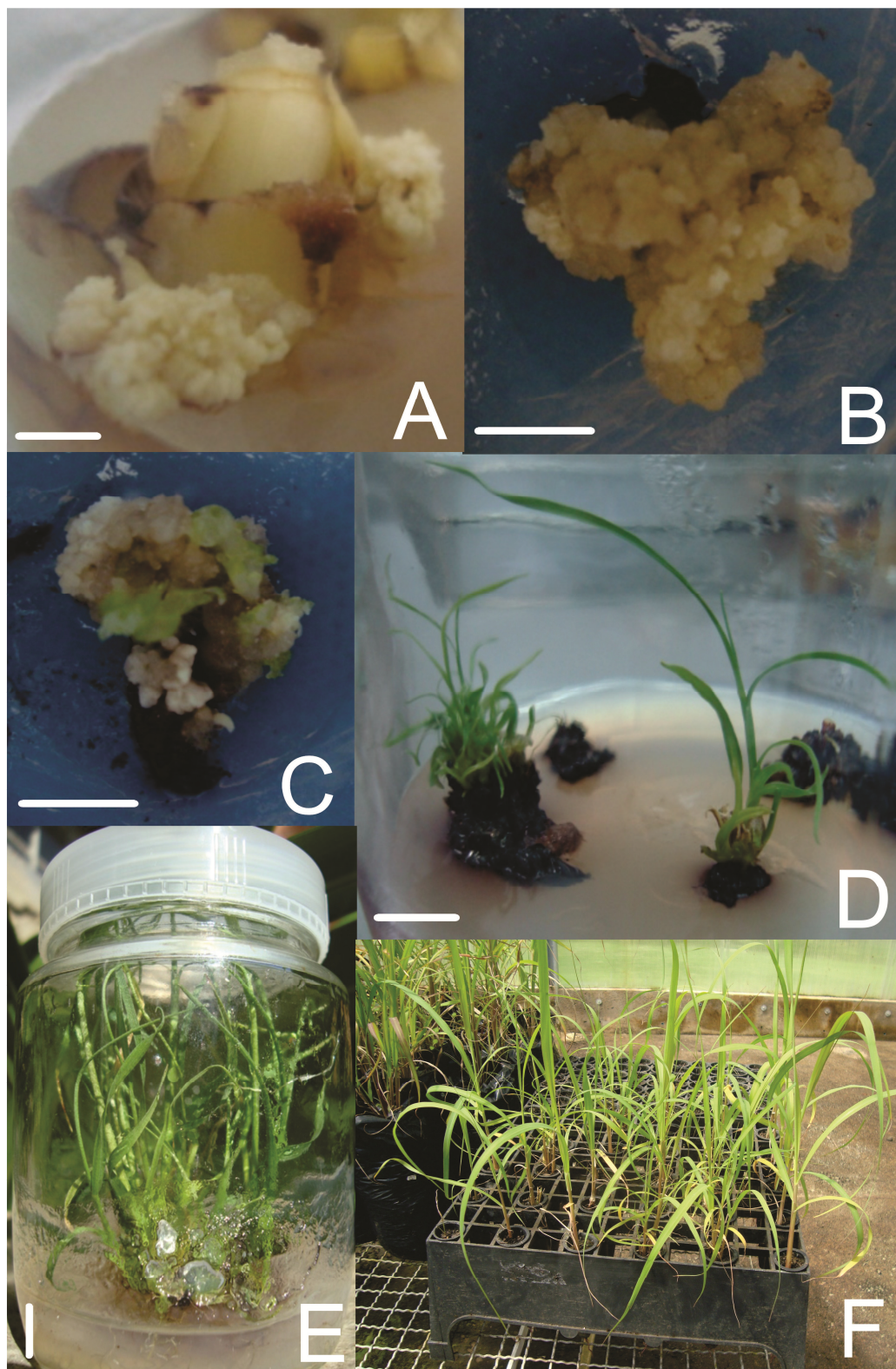


FIGURA 1. Etapas da regeneração de cana-de-açúcar, clone RB986419. Desenvolvimento inicial de calos embriogênicos (A); Detalhe do calo embriogênico (B); calo embriogênico com brotações (C); Desenvolvimento inicial de plântulas (D); Desenvolvimento e enraizamento *in vitro* das plântulas (E); Plantas em casa de vegetação (F). Barra: 1 cm.

A desdiferenciação dos explantes ocorreu uma semana após a inoculação. Esse cultivar desenvolveu muitos calos não embriogênicos, com aspecto mucilaginoso, nas concentrações de 3 a 27 μM de 2,4-D. Esses calos são macios e não friáveis, se desmancham facilmente e não dão origem aos calos embriogênicos, pois sua composição bioquímica é diferente (RODRÍGUEZ et al. 1995; NIEVES et al., 2003). Com relação à oxidação do material, os níveis foram elevados para todos os tratamentos testados, tanto no primeiro (Tabela 3), quanto no segundo experimento (Tabela 4), não havendo diferenças significativas em função das doses de 2,4-D.

TABELA 3. Efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos, no cultivar RB966928 de cana-de-açúcar, após 40 dias de cultivo *in vitro*.

Concentração de 2,4-D (μM)	% Explantes		
	Calos Embriogênicos	Calos	Oxidados
1	0 c	26 b	100 a
3	8 b	54 ab	88 a
9	24 ab	58 ab	90 a
16	30 a	76 a	84 a
27	18 ab	60 ab	78 a
C.V. (%)	17,1	10,6	5,5

Médias seguidas de letras idênticas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Essa oxidação ocorre pela lesão nos tecidos para a retirada dos explantes, formado polifenóis, que formam quinonas e substâncias fitotóxicas inibidoras do crescimento celular, aumentando assim o escurecimento dos explantes (AMORIN, 1985, in UTINO, et al., 2001). A redução dessa oxidação eleva a porcentagem de formação de massas calosas no material vegetal.

Houve brotações precoces em explantes de 3 μM de 2,4-D, observados após 40 dias, nos calos embriogênicos formados no primeiro experimento realizado.

Possivelmente, a quantidade de citocinina do material vegetal era elevada, enquanto que a concentração de auxina presente no meio de cultura estava baixa. Essa diferença no balanço hormonal auxilia nas brotações precoces. Para evitar esse resultado antecipado, quantidades elevadas de 2,4-D devem ser utilizadas no meio de indução (LAKSHMANAN et al., 2006).

A transferência dos explantes com calos embriogênicos para as placas de Petri, resultaram em um maior desenvolvimento inicial da embriogênese somática no cultivar. Porém, após 15 dias nesse meio de cultura, os explantes sofreram oxidação, acarretando na morte das massas embriogênicas. MACEDO (2010) obteve altas taxas de oxidação do material submetidos ao tratamento de maturação dos calos embriogênicos após 7 dias de cultivo *in vitro*.

Foi observada a formação de plântulas albinas em meio de cultura com 3 μM de 2,4-D, após uma semana *in vitro*. Não houve desenvolvimento dessas plântulas e as massas calosas que lhe deram origem também sofreram oxidação.

O segundo experimento foi realizado com as concentrações de 2,4-D que apresentaram as melhores porcentagens para obtenção de calos embriogênicos (3, 9 e 16 μM). Apesar do RB966928 possuir melhores resultados de formação dessas massas calosas em 27 μM (Tabela 3), esses não regeneraram plântulas, ao contrário de 3 μM de 2,4-D que, com apenas 8% desses calos formados, teve grande quantidade de brotações. Assim foram padronizadas as concentrações para repetição do experimento.

Comparando a formação de calos embriogênicos do primeiro experimento (Tabela 3), a repetição deste mostrou que a indução da embriogênese somática foi superior, principalmente para os três tratamentos analisados. Resultado semelhante com o obtido para o clone RB986419, onde a idade fisiológica e época de coleta do

material vegetal utilizado pode ter influenciado nos resultados superiores do segundo experimento.

TABELA 4. Efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos, no cultivar RB966928 de cana-de-açúcar, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Concentração de 2,4-D (μM)	% Explantes		
	Calos Embriogênicos	Calos	Oxidados
3	27 ab	54 b	94 a
9	33 ab	66 ab	96 a
16	41 a	80 a	84 a
C.V. (%)	78,7	49,7	18,5

Médias seguidas de letras idênticas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Após a transferência para meio de regeneração foi observado o início das brotações, a partir do 15° dia. O desenvolvimento das plantas e enraizamento ocorreram a partir do 46° dia. Dos três tratamentos realizados para o cultivar RB966928, a formação de plântulas ocorreu somente na concentração de 16 μM , com 68% plântulas.

As plântulas em casa de vegetação provenientes de cultura de tecidos, suplementadas com meio MS líquido a cada 30 dias, não demonstraram nenhuma expressão fenotípica atípica.

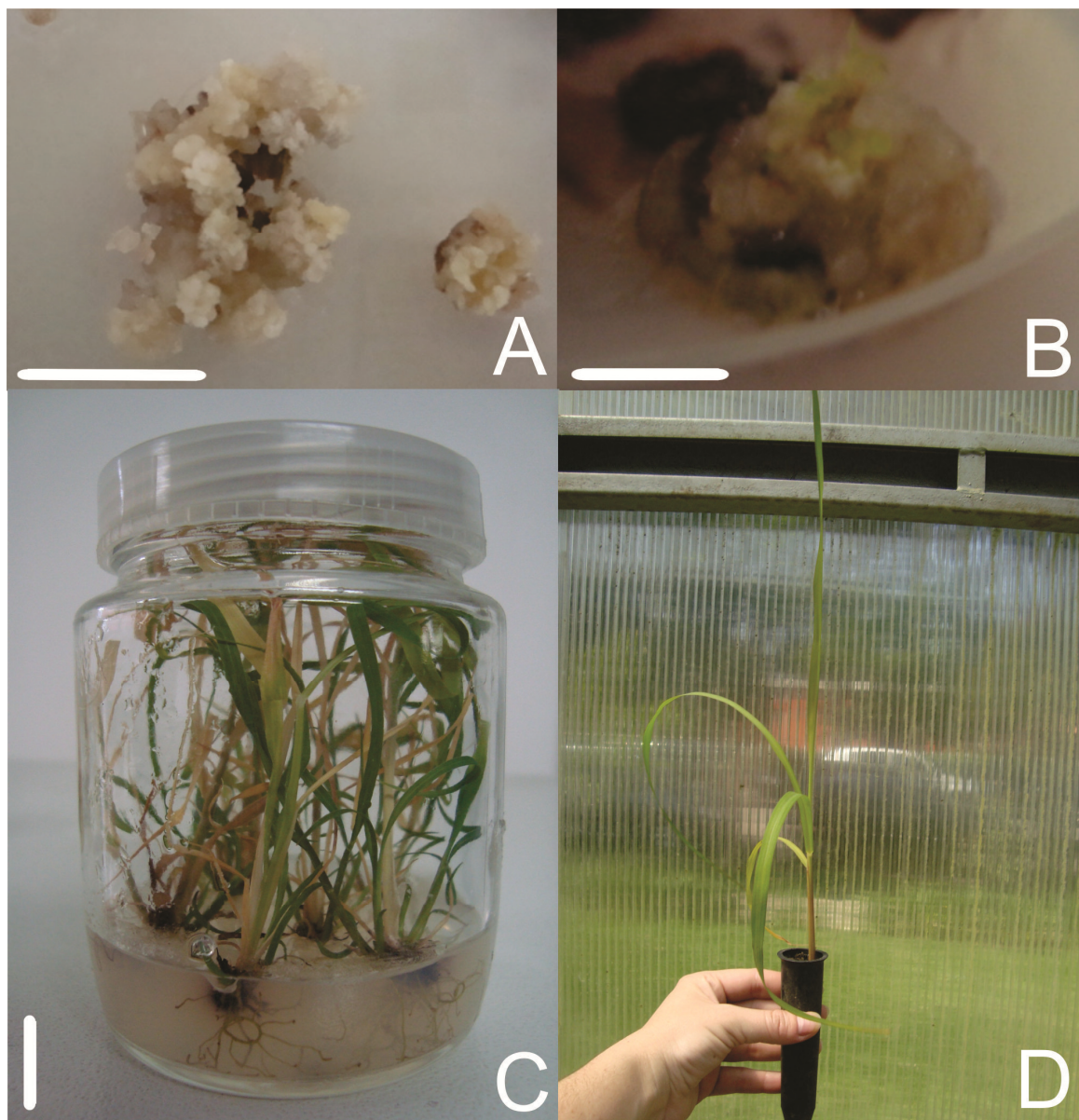


FIGURA 2. Etapas da regeneração do cultivar RB966928. Calos embriogênicos (A), brotações de plântulas em meio de regeneração (B), plantas de cana-de-açúcar *in vitro* enraizadas (C) e desenvolvimento em casa de vegetação (D). Barra: 1 cm.

3.4 CONCLUSÕES

- Para o clone RB986419, recomenda-se a utilização de 9 μM de 2,4-D para a obtenção de calos embriogênicos;
- Para o cultivar RB966928 é recomendado a utilização de 16 μM de 2,4-D para a obtenção de calos embriogênicos;
- Houve 28% de sobrevivência de plântulas para o clone RB986419 e 68% para o cultivar RB966928 durante a aclimatização.

3.5 REFERÊNCIAS

- ARENCEBIA, A.; MOLINA, P.; DE LA RIVA, G. e SELMAN-HOUSSEIN, G. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. **Plant Cellular Reports**, 14:305-309, 1995.
- CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41(3):385-391, 2006.
- CONAB. Cana-de-Açúcar. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/boletim_cana_setembro_2010.pdf Arquivo consultado em 15/10/2010.
- DE VITA, A.M. Indução e controle da embriogênese somática em cultivares de cana-de-açúcar: aspectos fisiológicos e bioquímicos. Campos dos Goytacazes: Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, p.41, 2008.
- DESAI, N.S.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Simple and reproducible protocol of direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Current Science**, Bangalore, 87:764-768, 2004.
- DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; PIERUZZI, F.P.; FHOH, E.I.S. Polyamines, amino acids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. **Seed Science and Technology**, 37:1-5, 2009.
- 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**, 4(11):1250-1255, 2005.
- GALLO-MEAGHER, M.; ENGLISH, R.G., ABOUZID, A. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, 36:37-40, 2000.
- GARCIA, R.; CIDADE, D.; CASTELLAR, A.; LIPS, A.; MAGIOLI, C.; CALLADO, C.; MANSUR, E. *In vitro* morfogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type on growth regulator. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 90:181-190, 2007.
- 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-SPI/Embrapa-CNPQ. p.533-568, 1999.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de Biotecnologia**. CCA/UFSC. Edição da Steinmacher. p.41, 2006.

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

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

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

LAKSHAMANAN, P. Invited review addendum: somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review ‘sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities’. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, 41(4):345–363, 2006.

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.

MACEDO, A.F. Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar. Dissertação. Universidade de São Paulo, p.90, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum** 15:473-479, 1962.

NIEVES, N.; SEGURA-NIETO, M.; BLANCO, M.A.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J.I.; CASTILLO, R. biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, 39:343-345, 2003.

NUNES, E.C.; CASTILHO, C.V.; MORENO, F.N.; VIANA, A.M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 70(3):259-268, 2002.

RIDESA – Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar. Relatório Técnico – ano 2008. Universidade Federal do Paraná, p.88, 2009.

RIDESA – Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar. Liberação Nacional de novas Variedades “RB” de Cana-de-açúcar – Março 2010. Universidade Federal do Paraná, p.64, 2010.

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

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

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa AAB*) *in vitro*. I. Concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal – SP, 23(2):225-229, 2001.

WILLIAMS, E.S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, 57:443-462, 1986.

4 CAPÍTULO II: INTENSIDADE LUMINOSA E CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CULTIVAR DE CANA-DE-AÇÚCAR RB855156

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura muito plantada em regiões tropicais e subtropicais e possui como principais produtos o etanol e o açúcar. O Brasil é o maior produtor mundial, e a cultura está inserida em diversos programas de melhoramento genético. A cultura de tecidos auxilia na obtenção de plantas livres de patógenos e possibilita a transformação genética de plantas. Para isso, são necessários protocolos para obtenção de embriogênese somática definidos, otimizados e adaptados a cada cultivar estudado. Entretanto, há vários fatores que influenciam no cultivo *in vitro*, entre eles está a luminosidade. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a formação de calos embriogênicos em diferentes ambientes luminosos e concentrações de 2,4-D do cultivar RB855156. Folhas imaturas com 10 meses foram utilizadas como fonte de explantes e a desinfestação foi realizada com álcool 70%, solução de hipoclorito a 2% e lavagens com água deionizada estéril. O meio de cultura foi MS com três concentrações de 2,4-D (3, 9 e 16 μM) e os explantes foram seccionados em tamanhos de 8 x 4 mm. Os frascos foram colocados em quatro ambientes para a formação dos calos embriogênicos: iluminado ($57 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), pouca luz ($15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), penumbra ($0,4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e escuro ($0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A formação de calos embriogênicos ocorreu em todas as concentrações de 2,4-D e ambientes analisados, porém os explantes condicionados no escuro tiveram a maior formação de calos embriogênicos (entre 24 e 26%). Calos embriogênicos formados em ambiente iluminado e de pouca luz induziram brotações cinco dias antes daquelas provenientes de calos embriogênicos condicionados anteriormente em penumbra e escuro após transferência para meio de regeneração. Calos embriogênicos tiveram melhor formação em ambiente sem iluminação, em todas as concentrações de 2,4-D testadas e esse ambiente auxiliou na diminuição da oxidação dos explantes.

Palavras-chave: Luminosidade, auxina, *Saccharum* spp.

4 CHAPTER II: LIGHT INTENSITY AND CONCENTRATION OF 2,4-D IN SOMATIC EMBRYOGENESIS OF CULTIVAR CANE SUGAR RB855156

ABSTRACT

Sugarcane is a crop widely cultivated in tropical and subtropical regions and has with main products the sugar and the ethanol. Brazil is the largest producer in the world and this culture is inserted in various breeding program. The tissue culture help in the achievement of plant free of pathogen and enables the genetic transformation of plant. For the achievement of transgenic plants is necessary define and optimize protocols of in vitro regeneration for each studied cultivar. However there are several factors that influence the in vitro culture, among them is the luminosity. Thus the aim of this work was evaluate the formation of embryogenic callus in the RB855156 cultivar treated with different concentrations of 2,4-D and different light environments. Immature leaves, extracted of plants with 10 months old, were used as source of explants. The leaves were disinfected with sterile water, alcohol 70% and hypochlorite at 2%. The culture media was MS (Murashige and Skoog, 1962) with three concentrations of 2,4-D (3, 9 and 16 μM) and the explants were cut in size of 8 x 4 mm. After the isolation the flasks were placed in different light environments: light ($57 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); half-light ($15 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); shade ($0.4 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and dark ($0 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). The formation of embryogenic callus occurred in all 2,4 D concentrations and environment studies, however the explants placed on dark had higher concentrations of embryogenic callus (between 24 and 26%). Embryogenic callus formed in light and low light environment induced shoots five days before that callus obtained on shade and dark environment. Embryogenic callus had better formation in environments without light in all 2,4-D concentration, and this environment help to decrease the explants oxidation.

Key-word: Light, *Saccharum* spp., auxin

4.1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma cultura de grande importância, e cultivada em larga escala nas regiões tropicais e subtropicais. Também é a principal matéria prima para a produção de açúcar e etanol. O Brasil é o maior exportador mundial de açúcar, motivo principal para a cultura estar freqüentemente inserida em programas de melhoramento genético (CIDADE et al., 2006).

Uma das preocupações de programas de melhoramento genético é a obtenção de cultivares com alta precocidade de maturação. Com uma riqueza agrícola, alta resistência as principais doenças e elevada produtividade, o RB855156 é um dos principais cultivares plantados para colheita de início de safra (RIDESA, 2010).

A regeneração *in vitro* é um método que utiliza pequenos órgãos, tecidos ou segmentos foliares para formação e manutenção de plantas em ambiente controlado (GUERRA e NODARI, 2006). Esse método auxilia na obtenção de plantas geneticamente transformadas através de embriogênese somática. Desta forma, são necessários protocolos de regeneração adaptados e responsivos para cada cultivar de cana-de-açúcar estudado.

Os reguladores de crescimento vegetal, acrescidos ao meio de cultura, são a forma mais utilizada para se induzir resposta morfogênética em tecidos vegetais *in vitro* (JIMÉNEZ, 2005). Dentro deste grupo, as auxinas sintéticas são utilizadas para se obter calos embriogênicos, sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o principal regulador vegetal utilizado para a cultura da cana-de-açúcar (CHENGALRAYAN e GALLO-MEAGHER, 2001; LAKSHMANAN, 2006; GARCIA et al., 2007; WATT et al., 2009). Segundo MARCANO et al. (2002) a presença de 2,4-D

no meio de cultura induz a formação de calos e apresenta uma resposta favorável na obtenção de calos embriogênicos.

A embriogênese somática pode ser afetada, positivo ou negativamente, por alguns fatores como, por exemplo: o tipo de explante, a composição do meio nutritivo, temperatura e a luminosidade (GUERRA et al., 1999; HUTCHINSON et al., 2000; GARCIA et al., 2007).

A luz regula o desenvolvimento vegetal, processo que é denominado de fotomorfogênese (KENDRICK e KRONENBERG, 1994). Segundo ECONOMOU e READ (1987) há interferência pela luz nesse processo por meio do comprimento de onda, intensidade luminosa ou fluxo de fótons e fotoperíodo, tanto *in vitro* como *ex vitro*. Sendo um fator determinante no desenvolvimento vegetal (GUERRA et al., 1999), não há muitos estudos e descrições da influência da luminosidade sobre a formação de calos embriogênicos em cana-de-açúcar. GARCIA et al. (2007) relata que a luz influencia na resposta dos explantes aos reguladores de crescimento vegetal, e que a indução de calos embriogênicos é conseguida no escuro.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e diferentes ambientes luminosos na formação de calos embriogênicos no cultivar RB855156.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Origem do material e assepsia

Segmentos de folhas imaturas de cana-de-açúcar, cultivar RB855156, foram utilizados como explantes. Estes segmentos foram retirados do ápice de plantas com 10 meses de idade, provenientes de plantas cultivadas na Estação Experimental de Paranaíba, localizado no município de Paranaíba – PR. Os testes foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, situado no Setor de Ciências Agrárias na Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Cilindros de aproximadamente 8 x 150 mm foram desinfestados em câmara de fluxo vertical da seguinte forma: três lavagens com água deionizada estéril, um minuto em álcool 70%, vinte minutos em hipoclorito de sódio 2% contendo duas gotas de detergente neutro líquido e três lavagens com água deionizada estéril. Os palmitos foram cortados, retirando as ponteiros e as folhas mais externas para a obtenção dos explantes de 4 mm de comprimento. Os tratamentos foram realizados com 10 repetições e cinco explantes em cada frasco.

4.2.2 Meio de indução e condições de cultura *in vitro*

O meio de cultura utilizado foi MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com três concentrações da auxina 2,4-D: 3, 9 e 16 μM , acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C a 1,5 atm por 20 min.

Os frascos foram colocados em sala de crescimento, sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas, para a indução da embriogênese somática nos seguintes ambientes, sendo a irradiância de fótons medida com luxímetro FLUKE 5500A:

- Ambiente iluminado – $57 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;
- Ambiente de pouca luz – $15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;
- Ambiente de penumbra – $0,4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;
- Ambiente escuro - $0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

4.2.3 Regeneração *in vitro* e condições *ex vitro*

Após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio de indução, as massas embriogênicas foram transferidas para meio de cultura MS sem adição de regulador de crescimento (meio de regeneração). Todos os frascos, independente do local de indução inicial, foram colocados sob intensidade luminosa de $57 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para a regeneração das plântulas, em temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h.

Aos 30 dias, as plântulas formadas foram separadas e colocadas em novo meio de regeneração para a formação de raízes. Após essa formação, as plântulas foram separadas novamente e colocadas em uma bandeja com água deionizada para evitar a perda de água. As raízes foram lavadas para retirada do excedente do meio de cultura. As plântulas foram colocadas em bandeja de alumínio, com 100 mL de água deionizada, e vedada com saco plástico transparente, para manter a umidade das mesmas. O material foi colocado em sala de crescimento, nas mesmas condições citadas anteriormente.

Com uma semana de aclimatização, as plântulas foram transferidas para tubetes, de 125 x 34 mm, contendo o substrato comercial Plantmax HT[®] e colocadas em casa de vegetação, com duas nebulizações ao dia, temperatura variando entre 28° e 35°C e UR de 60%. Aos 30 e 60 dias, as plântulas receberam suplementação de solução líquida do meio MS, contendo os macro e micronutrientes e as vitaminas, para auxiliar na sua nutrição e desenvolvimento. Após 60 dias, as plântulas foram transferidas para sacos de 16 x 22 cm de mudas, com o mesmo substrato anterior.

4.2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com arranjo fatorial 4 x 3 (diferentes luminosidades x concentração de 2,4-D) dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foi utilizando o programa computacional MSTAT (versão 2.1 – Michigan State University, 1995).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação dupla entre os fatores luminosidade e concentração de 2,4-D foi estatisticamente significativa para as três variáveis analisadas, indicando que esses fatores foram dependentes (Tabela 5).

TABELA 5. Análise de variância dos dados da porcentagem de explantes provenientes do palmito de cana-de-açúcar, cultivar RB855156, analisadas em diferentes concentrações de 2,4-D e luminosidade, por 40 dias em meio de indução.

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.		
		Calos Embriogênicos	Calos	Oxidação
Fator Luminosidade (A)	3	1122.431**	1315.556**	6354.167**
Fator 2,4-D (B)	2	556.458**	3430.000**	330.833*
Interação AxB	6	440.347**	3825.556**	1464.167**
Erro	108	19.931	84.444	2591.742
Total	119			
Coeficiente de Variação (%)		27,40	10,94	10,83
Teste Bartlett (X^2)		16,47 ^{ns}	5,69 ^{ns}	13,72 ^{ns}

ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

A maior formação de calos embriogênicos ocorreu em ambiente sem iluminação para todas as concentrações de 2,4-D testadas (Tabela 6). Analisando essa formação nos diferentes ambientes, mas com mesma concentração de 2,4-D, observa-se que em 9 μ M da auxina não houve diferença estatística entre ambiente iluminado e escuro (24 e 26% respectivamente). Na concentração de 16 μ M de 2,4-D, as maiores porcentagens foram em ambiente iluminado (19%), de pouca luz (24%) e de escuro (24%). Essas variações de respostas *in vitro* demonstram que explantes retirados do mesmo cultivar se comportam de maneiras distintas, sendo

necessário ajustar a melhor concentração e fotoperíodo para a obtenção dos embriões somáticos.

GARCIA et al. (2007) relatam que o 2,4-D pode induzir calos embriogênicos no escuro e na luz, porém sob iluminação observaram a formação de organogênese indireta e formação de massas pró-embriogênicas que não chegaram à maturidade.

TABELA 6. Porcentagem média de explantes formando calos embriogênicos em cana-de-açúcar, comparando meio de indução e luminosidade.

Ambiente	Concentração de 2,4-D (μM)		
	3	9	16
Iluminado	8 bc C	24 a A	19 a B
Pouca Luz	4 c B	8 c B	24 a A
Penumbra	12 b AB	14 b A	8 b B
Escuro	24 a A	26 a A	24 a A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Visualmente foi observado que, em frascos mantidos no escuro, esses calos tiveram uma maior formação de calos embriogênicos, com o aspecto nodular, compactos e de coloração mais amarelada (Figura 3A). Nos demais ambientes, os calos apresentaram coloração esbranquiçada (Figura 3C), muitas vezes com pontuações arroxeadas e aspecto mais arredondado (Figura 3D).

TABELA 7. Porcentagem média de explantes formando calos não embriogênicos em cana-de-açúcar, comparando meio de indução e luminosidade.

Ambiente	Concentração de 2,4-D (μM)		
	3	9	16
Iluminado	48 b B	84 bc A	92 ab A
Pouca Luz	52 b B	100 a A	100 a A
Penumbra	96 a A	90 ab AB	82 a B
Escuro	98 a A	76 c B	90 ab A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação à formação de calos não embriogênicos, com exceção dos ambientes iluminado e de pouca luz em concentração de 3 μM de 2,4-D, os demais ambientes testados resultaram em uma alta formação dessas massas calosas (Tabela 7). Aparentemente, para essa concentração de 2,4-D, aumentou a formação de calos não embriogênicos com a redução da luminosidade. Esse fator não foi observado para os outros tratamentos. Em 9 μM de 2,4-D sob pouca luz, houve formação calos em 100% dos explantes. Porém, em 16 μM da auxina, não houve diferença estatística para nenhum ambiente analisado. O aspecto desses calos eram mucilaginosos, macios e não friáveis, amplamente relatado na literatura (HO e VASIL, 1983; LIMA et al., 2001; GANDONOU et al., 2005; GARCIA et al., 2007).

Houve uma redução na oxidação dos explantes colocados no escuro para os tratamentos de 3 e 9 μM de 2,4-D, sem diferença estatística para 16 μM em ambiente luminoso e escuro (Tabela 8). A incubação no escuro é realizada principalmente por auxiliar na redução da taxa oxidativa dos explantes. Uma vez controlado esse fator, a embriogênese somática é alcançada com maior facilidade em cana-de-açúcar (SILVA et al., 2001).

TABELA 8. Porcentagem média de explantes oxidados em cana-de-açúcar, comparando meio de indução e luminosidade.

Ambiente	Concentração de 2,4-D (μM)		
	3	9	16
Iluminado	81 b B	100 a A	68 b C
Pouca Luz	88 b B	100 a A	100 a A
Penumbra	100 a A	82 b B	94 a A
Escuro	54 c B	64 c A	72 b A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Segundo GARCIA et al. (2007), a luz pode mudar o caminho regenerativo da embriogênese somática para organogênese e ativar diferentes tipos de células em

resposta ao regulador de crescimento vegetal. Essa hipótese pode ter ocorrido com os calos formados em ambiente iluminado e de pouca luz, uma vez que as brotações foram observadas cinco dias antes daquelas provenientes de calos embriogênicos condicionados anteriormente de penumbra e escuro. As brotações tiveram início no 15º dia para luz e pouca luz e 20º dia para penumbra e escuro, após inoculadas em meio de regeneração.

As brotações provenientes de indução em ambiente iluminado e de penumbra sofreram oxidação, ocasionando a morte dos explantes. Os calos formados em pouca luz e escuro tiveram uma porcentagem de regeneração de 28 e 40 plântulas, respectivamente. A alongação das plântulas e o enraizamento das touceiras ocorreram a partir de 45 dias pós subcultivo.

As plântulas em casa de vegetação provenientes de cultura de tecidos, suplementadas com meio MS líquido, não demonstraram nenhuma expressão fenotípica atípica.

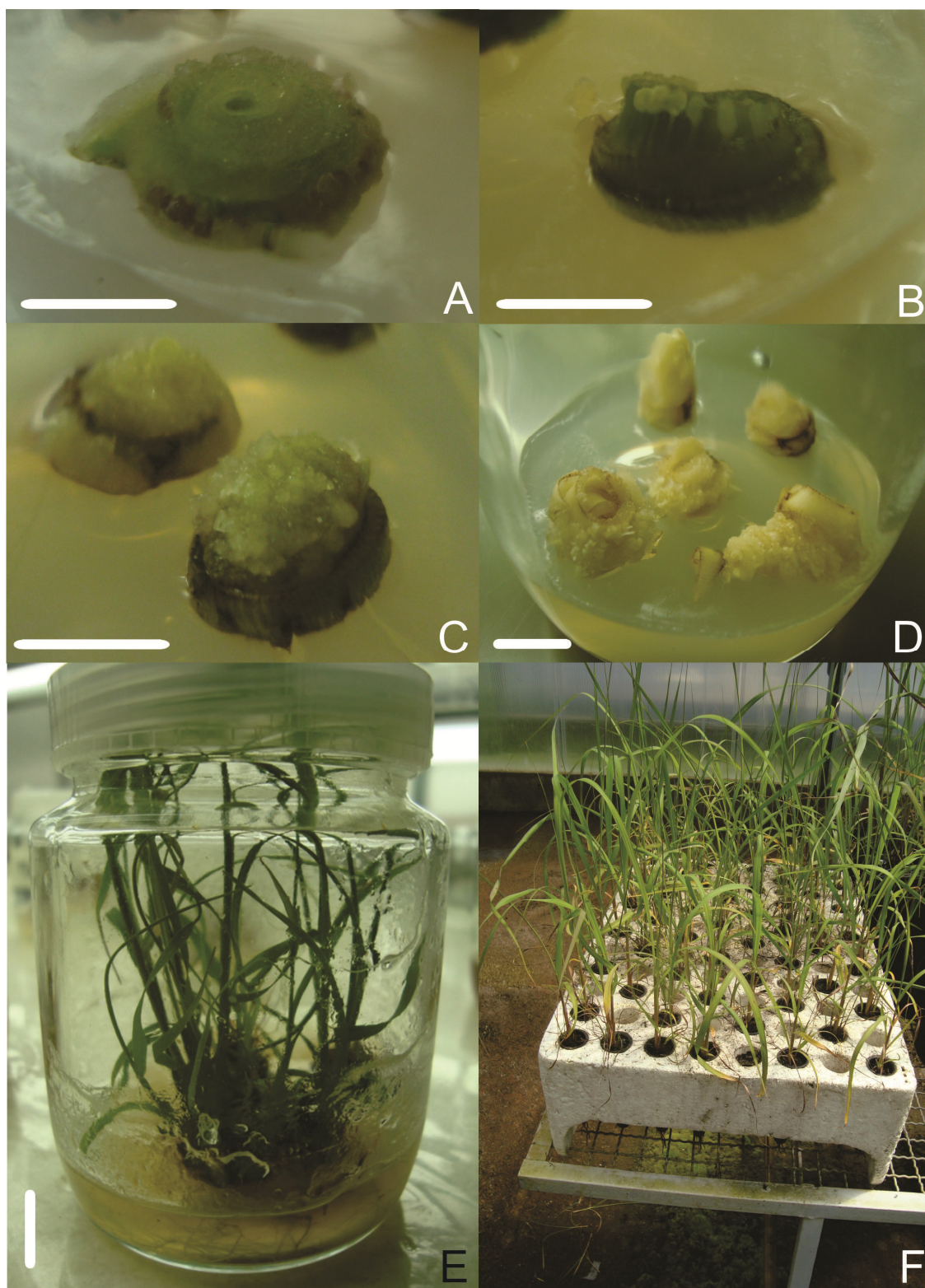


FIGURA 3. Etapas da regeneração do cultivar RB855156. Formação de calos em ambiente iluminado (A), calos de aspecto translúcidos formados em ambiente de pouca luz (B), calos de coloração esbranquiçada formados em ambiente de penumbra (C), calos embriogênicos formados no escuro (D), regeneração de plântulas *in vitro* (E) e desenvolvimento das plantas em casa de vegetação (D). Barra: 1 cm.

4.4 CONCLUSÕES

- Calos embriogênicos tiveram melhor formação em ambiente sem iluminação, nas concentrações de 3, 9 e 16 μM de 2,4-D, sendo recomendado assim a utilização da menor concentração (3 μM) em função da economia de regulador de crescimento vegetal;
- A ausência de luz promoveu uma redução da oxidação dos explantes em 3 e 9 μM de 2,4-D no cultivar RB855156.

4.5 REFERÊNCIAS

- CHENGALRAYAN, K.; GALLO-MEAGHER, M. Effects of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, 37:434-439, 2001.
- CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41(3):385-391, 2006.
- ECONOMOU, A.S.; READ, P.E. Light treatment to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **Horticultural Science**, 22:751-754, 1987.
- GANDONOU, Ch.; ERRABIL, 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**, 4(11):1250-1255, 2005.
- GARCIA, R.; CIDADE, D.; CASTELLAR, A.; LIPS, A.; MAGIOLI, C.; CALLADO, C.; MANSUR, E. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot ápices of sugarcane are determined by light and type on growth regulator. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 90:181-190, 2007.
- 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-SPI/Embrapa-CNPQ. p.533-568, 1999.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de Biotecnologia**. CCA/UFSC. Edição da Steinmacher. p.41, 2006.
- HO, J.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny somatic embryos. **Protoplasma**. 118:169-180, 1983.
- HUTCHINSON, M.J.; SENARATNA, T.; SAHI, S.V.; SAXENA, P.K. Light mediates endogenous plant growth substances in thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium hypocotyls cultures. **Journal of Plant Biotechnology**, 9:1-6, 2000.
- JIMÉNEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, 47:91-110, 2005.
- KENDRICK, R.E.; KRONENBERG, G.H.M. **Photomorphogenesis in Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1994.
- LAKSHAMANAN, P. Invited review addendum: somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review ‘sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities’. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, 41(4):345–363, 2006.

LIMA, M.A.C.; GARCIA, R.O.; MARTINS, G.S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, 24(1):73-77, 2001.

MARCANO, A.K.; PEDRO, M.G.; OROPEZA, M.; GARCIA, E. Optimizacion del processo de embriogenesis somática em variedades venezolanas de caña de azucar. **Acta Científica Venezolana**, 53: 251-257, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum** 15:473-479, 1962.

RIDESA – Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar. Catálogo Nacional de Variedades “RB” de Cana-de-açúcar – março 2010. Universidade Federal do Paraná, p.136, 2010.

SILVA, M.M.A.; HERCULANO, L.; CARNEIRO, F.W.O.; WILLADINO, L.; CAMARA, T. (2001) Efeito da luminosidade na formação de embriões somáticos de cana-de-açúcar *in vitro*. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0800-1.pdf> Arquivo consultado dia 22/11/2009.

WATT. M.P.; BANASIAK, M.; REDDY, D.; ALBERTSE, E.H.; SNYMAN, S.J. In vitro minimal growth storage of *Saccharum spp.* hybrid (genotype 88H0019) at two stages of direct somatic embryogenic regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 96(3):263-271, 2009.

5 CAPÍTULO III: INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E 2,4-D NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.), CULTIVAR RB72454

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas brasileiras, com uma grande área plantada e seus principais produtos são o açúcar e o etanol. Com o aumento das exportações de açúcar, tem-se buscado elevar a produtividade das lavouras através do melhoramento genético. Uma possibilidade para obtenção de cana-de-açúcar mais resistente a estresses bióticos e abióticos é a transformação genética. Para isso, são necessários protocolos de regeneração *in vitro* de plantas bem definidos e otimizados. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência do meio de cultura, e diferentes concentrações de 2,4-D para o cultivar RB72454 de cana-de-açúcar, na formação de calos embriogênicos. Foram utilizados como fonte de explantes, folhas imaturas com 10 meses de idade provenientes do município de Paranaíba – PR. A desinfestação foi realizada com álcool 70%, hipoclorito a 2% com duas gotas de detergente líquido e lavagens com água deionizada estéril. Os explantes foram retirados de cilindros foliares de 8 x 150 mm segmentado em 4 mm. Foi realizado um experimento em bifatorial testando o meio de cultura (MS, MS/2 e MS/Fe) e cinco concentrações de 2,4-D (1, 3, 9, 16 e 27 μM). Todos os frascos permaneceram no escuro até a formação dos calos embriogênicos. Houve interação significativa para as três variáveis analisadas. A formação de calos embriogênicos teve melhores resultados em meio MS/2, nas concentrações de 9 e 16 μM (52 e 50% respectivamente). A oxidação foi reduzida em concentrações de 9, 16 e 27 μM de 2,4-D em meio MS/2.

Palavras-chave: auxina, macro e micronutrientes.

5 CHAPTER III: THE INFLUENCE OF CULTURE MEDIUM AND 2,4-D IN SOMATIC EMBRYOGENESIS OF SUGARCANE (*Saccharum* spp.) CULTIVAR RB72454

ABSTRACT

Sugarcane is one of the major Brazilian crops and had a big planted area with the sugar and ethanol as the products. Due the increase in sugar export, the raise of the yield have been search through the breeding programs. One possibility for the achievement of sugarcane more resistant to biotic and abiotic stress is the genetic transformation. For this reason is necessary define and optimize protocols of in vitro regeneration. The aim of this work was analyze the influence of the culture media and different concentrations of 2,4-D in the formation of embryogenic callus in the RB72454 sugarcane cultivar. Immature leaves with 10 months old were used as source of explants. The leaves were disinfected with sterile water, alcohol 70% and hypochlorite at 2% with two drops of detergent. Leaf cylinders with 0,8 x 1,5mm, sliced in 4mm was placed on culture media according to the treatment used. The experimental design was a bi-factorial with three culture media (MS, MS half-strength and MS half-iron) and five concentrations of 2,4-D (1, 3, 9, 16 and 27 μM). All flasks kept in the dark until the formation of embryogenic callus. There was significant interaction among the three parameters. The formation of embryogenic callus presented better results in MS half-strength media, in concentrations of 9 and 16 μM (52 and 50% respectively). The oxidation was reduced in the concentrations of 16 and 27 μM of 2,4-D and in MS half-strength media.

Keywords: auxin, macro and micronutrients.

5.1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea, pertencente à família *Poaceae*, muito importante economicamente por possuir como principais produtos, o açúcar e etanol. É a umas das culturas mais plantadas no Brasil, com uma área plantada aproximada de 8.167,5 mil hectares e a produção estimada em 651.514,3 mil toneladas de cana moída. O Paraná é o terceiro maior produtor nacional, com aproximadamente 48.786,8 mil toneladas de cana moída em todo o estado (CONAB, 2010).

Um cultivar muito plantado no Brasil é o RB72454, liberado para plantio em 1979. Se destacou por anos por possuir características como a alta resistência a ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*), boa germinação de colmos e baixo florescimento. Com maturação média e alto teor de sacarose, matem boas características para colheita ao longo do período de safra (RIDESA, 2010).

Com o aumento das exportações e cultivo da cultura para a produção de etanol, ocorreu uma ampliação das pesquisas em cana-de-açúcar. O melhoramento genético tradicional visa à obtenção de cultivares mais resistentes a estresses bióticos e abióticos. Porém, a herança de características pela cultura é muito complexa, dificultando estudos de identificação e modo de ação de genes individuais (MATSUOKA et al., 1999). A engenharia genética vem como uma forma de auxiliar na introdução de genes com características desejáveis (JOYCE et al., 2010) e reduzir o tempo de obtenção de cultivares elite de cana-de-açúcar.

Para a transformação genética de cana-de-açúcar, são necessários protocolos de regeneração *in vitro* definidos e otimizados. Sendo essa espécie um híbrido interespecífico, cada cultivar possui comportamento distinto, tanto no campo

quanto *in vitro*, onde a resposta morfogênica é muito influenciada pelo genótipo. Deste modo, os protocolos de regeneração *in vitro* devem ser adaptados a cada cultivar a ser propagado.

A embriogênese somática é o caminho pelo qual células somáticas se desenvolvem em estruturas que se assemelham a embriões zigóticos, isto é, estruturas bipolares e sem ligação ao tecido vascular (JIMÉNEZ, 2005). Essa é a estrutura celular mais utilizada para a obtenção de plantas geneticamente modificadas em cana-de-açúcar (LAKSHMANAN, 2006; JOYCE et al., 2010), pois pode ser utilizada tanto para a transformação direta de plantas, por biobalística (BOWER e BIRCH, 1992; GALLO-MEAGHER e IRVINE, 1996; FALCO et al., 2000; MOLINARI et al., 2007) quanto a indireta, por *Agrobacterium tumefaciens* (MANICKAVASAGAM et al., 2004; JOYCE et al., 2010).

A indução de um tecido vegetal *in vitro* é realizada com o uso de reguladores de crescimento vegetal, mais usualmente as auxinas sintéticas. Esses são considerados os mais importantes hormônios na regulação da embriogênese somática (COOKE et al., 1993) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é utilizado freqüentemente para obtenção de calos embriogênicos (GAJ, 2004).

Um grande problema de cultivo *in vitro*, para algumas espécies, é a elevada taxa oxidativa, observada pelo escurecimento dos tecidos lesados (UTINO et al., 2001), prejudicando o desenvolvimento dos explantes e reduzindo a multiplicação destes (CARNEIRO, 1997). Este processo oxidativo pode ser explicado pela liberação de compostos polifenólicos (GEORGE e SHERRINGTON, 1984) e fenólicos, limitando a obtenção de bons resultados *in vitro* (FLORES et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência do meio de cultura e a concentração de 2,4-D na formação dos calos embriogênicos do cultivar RB72454.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

5.2.1 Origem e assepsia do material vegetal

Foram utilizados como material vegetal folhas imaturas (palmitos) de plantas de cana-de-açúcar do cultivar RB72454, com aproximadamente 10 meses de idade, provenientes da Estação Experimental de Paranaíba, do município de Paranaíba - PR. Esses palmitos foram desinfestados em câmara de fluxo vertical da seguinte forma: três lavagens com água deionizada estéril, um minuto em álcool 70%, vinte minutos em hipoclorito de sódio 2% contendo duas gotas de detergente neutro líquido e três lavagens com água deionizada estéril. Os palmitos foram cortados, retirando as ponteiros e as folhas mais externas para a obtenção dos explantes com 5 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento.

5.2.2 Meio de indução e condições de cultivo *in vitro*

Foram analisadas a influência de três meios de cultura: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS com a metade das concentrações de macro, micronutrientes e vitaminas (MS/2), e MS com a metade da concentração de ferro (MS/Fe) em cinco concentrações da auxina 2,4-D: 1, 3, 9, 16 e 27 μM . Todos os meios de cultura

foram acrescidos de 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar e colocados 50 mL de meio em cada frasco. O pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C a 1,5 atm por 20 min.

5.2.3 Regeneração do material vegetal

Após 40 dias, os calos que não oxidaram foram transferidos para frascos de 200 mL com tampa de polipropileno, contendo 50 mL de meio de cultura MS sem adição de regulador de crescimento, para o desenvolvimento das plântulas e subsequente enraizamento. O material foi mantido em sala de crescimento, sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância de fótons de $57 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, medido com luxímetro FLUKE 5500A, e fotoperíodo de 16 horas.

5.2.4 Análise estatística

Foi realizado um fatorial duplo 3 x 5 (meio de cultura x concentração de 2,4-D) em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 10 repetições de 5 explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foi utilizando o programa computacional MSTAT (versão 2.1 – Michigan State University, 1995).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre os fatores meio de cultura e concentração de 2,4-D foi estatisticamente significativa para as três variáveis analisadas (Tabela 9), indicando que a resposta dessas variáveis é influenciada por todos os fatores, os quais são dependentes.

TABELA 9. Análise de variância dos dados da porcentagem de explantes provenientes do palmito de cana-de-açúcar, cultivar RB72454, analisadas em cinco concentrações de 2,4-D e três meios de indução, por 40 dias.

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.		
		Calos Embriogênicos	Calos	Oxidação
Fator Meio de Cultura (A)	2	10056.167**	1922.667**	3336.000**
Fator 2,4-D (B)	4	4135.167**	5604.000**	2622.667**
Interação Ax B	8	818.667**	536.000**	352.667**
Erro	135	6.478	93.333	101.037
Total	149			
Coeficiente de Variação (%)		12,70	12,35	12,14
Teste Bartlett (X^2)		27,98 ^{ns}	8,55 ^{ns}	11,52 ^{ns}

ns = não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

Analisando a formação de calos embriogênicos nos meios de cultura, houve 32% de indução em 16 μ M de 2,4-D em meio MS/Fe (Tabela 10). Meios MS e MS/2 formaram calos embriogênicos nas concentrações de 9 e 16 μ M de 2,4-D, com porcentagens de 16 e 18% respectivamente, para meio MS, e 52 e 50% para MS/2. Ao se comparar as concentrações de 2,4-D formado calos embriogênicos, para 1 μ M o melhor meio é o MS/Fe (8%). Para as concentrações de 3, 9, 16 e 27 μ M de 2,4-D, o meio MS/2 proporcionou uma quantidade de calos embriogênicos superior aos formados em meios MS e MS/Fe. Os calos embriogênicos formados nos três

diferentes meios de cultura e concentrações de 2,4-D mostraram-se compactos, amarelados e esbranquiçados, globulares, de fácil separação e em multiplicação constante. As diferentes respostas na calogênese nos diferentes meios de cultura suplementados com concentrações distintas de 2,4-D demonstram a importância desse regulador vegetal na indução de calos embriogênicos (JIMÉNEZ, 2005). A auxina 2,4-D é essencial para formação de massas calosas, e ocorre formação mesmo em baixas concentrações, necessitando de mais tempo para se formarem (HO e VASIL, 1983; HEERDT, 2008).

OLIVEIRA et al. (1996) relatam que a diminuição da concentração do meio MS não acarreta prejuízos na diferenciação de tecidos vegetais *in vitro*. Essa afirmação foi observada na para o cultivar RB72454, uma vez que o meio de cultura com redução de sais e vitaminas pela metade mostrou-se mais eficiente que o meio de cultura MS.

TABELA 10. Porcentagem média de explantes formando calos embriogênicos em cana-de-açúcar, cultivar RB72454.

Meio de Cultura	Concentração de 2,4-D (μM)				
	1	3	9	16	27
MS	0	4 c B	16 b A	18 c A	6 c B
MS/2	2 b D	34 a C	52 a A	50 a A	42 a B
MS/Fe	8 a C	8 b C	18 b B	32 b A	10 b C

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação aos calos não embriogênicos, houve a ocorrência de calos mucilaginosos na maioria dos explantes *in vitro*, principalmente em 1 μM de 2,4-D, em todos os meios testados. A concentração de 3 μM teve melhor resultado em meio MS, porém as concentrações 9, 16 e 27 μM de 2,4-D apresentaram porcentagens variando entre 82 e 90 % em todos os meios de cultura (Tabela 11).

TABELA 11. Porcentagem média de explantes formando calos não embriogênicos em cana-de-açúcar, cultivar RB72454.

Meio de Cultura	Concentração de 2,4-D (μM)				
	1	3	9	16	27
MS	62 a B	88 a A	88 a A	94 a A	90 a A
MS/2	62 a C	72 b BC	82 a AB	90 a A	86 a A
MS/Fe	50 b B	52 c B	82 a A	86 a A	90 a A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Levando em consideração que em reduzida oxidação há a possibilidade de maior formação de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (LAKSHMANAN, 2006), foi observado que no meio de cultura MS houve a redução da oxidação dos explantes, nas concentrações de 3, 9 16 e 27 μM de 2,4-D (Tabela 12). Para os meios MS/2 e MS/Fe, a baixa oxidação ocorreu em 16 μM de 2,4-D. Analisando as concentrações de 2,4-D, o meio de cultura MS/2 em concentrações de 1, 9, 16 e 27 μM possibilitou uma redução da taxa oxidativa no cultivar RB72454.

TABELA 12. Porcentagem média de explantes oxidados em cana-de-açúcar, cultivar RB72454

Meio de Cultura	Concentração de 2,4-D (μM)				
	1	3	9	16	27
MS	100 a A	80 a B	86 a B	80 a B	82 a B
MS/2	88 b A	82 a AB	74 b BC	56 b D	68 b CD
MS/Fe	98 ab A	88 a A	96 a A	72 a B	92 a A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A oxidação dos explantes é um fator limitante na obtenção de calos embriogênicos e regeneração de plantas (GEORGE e SHERRINGTON, 1984), observado também para a cana-de-açúcar. Para reduzir essa oxidação são utilizados antioxidantes, como o ácido cítrico e ácido ascórbico (LAKSHMANAN et al., 2006). GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) comentam que o tipo do explante, o genótipo, as condições de cultivo *in vitro* e os componentes do meio de cultura

também auxiliam na oxidação. Para esse experimento, a redução de sais proporcionou uma redução na oxidação (9, 16 e 27 μM de 2,4-D com 74, 56 e 68% de oxidados respectivamente), auxiliando na formação de calos embriogênicos (para as mesmas concentrações, 52, 50 e 42% respectivamente).

Após a transferência das massas calosas para meio de regeneração, pode ser observado a formação das brotações 25 dias após a inoculação, porém estas não concluíram o ciclo de formação por contaminações. De 15 frascos com calos embriogênicos, apenas um frasco, do meio MS/2 com concentração de 16 μM de 2,4-D formou brotações, porém ocorreu o desenvolvimento de uma plântula com uma fixa de pigmentação esverdeada em folhagem albina (Figura 5).

Essa variação fenotípica do material regenerado pode ter ocorrido por duas razões, variação somaclonal ou deficiência nutricional. A variação somaclonal abrange todos os tipos de variações que ocorrem nas plantas geradas *in vitro* a partir de células ou tecidos. Em cana-de-açúcar, a variação somaclonal pode originar plantas com deficiências e mudanças grosseiras no número de cromossomos (ARANTES e AZEVEDO, 1986), mas pode gerar plantas que apresentem um aumento no teor de sacarose e proporcionar resistência a doenças (RAJESWARI et al., 2009).

O ferro é o principal componente dos citocromos e é essencial para a síntese de clorofila. A deficiência desse micronutriente acarreta em clorose interveinal das folhas jovens (GUERRA e NODARI, 2006). A plântula regenerada *in vitro* pode ter sofrido tanto variação somaclonal como deficiência de ferro pela redução dos nutrientes do meio de cultura.

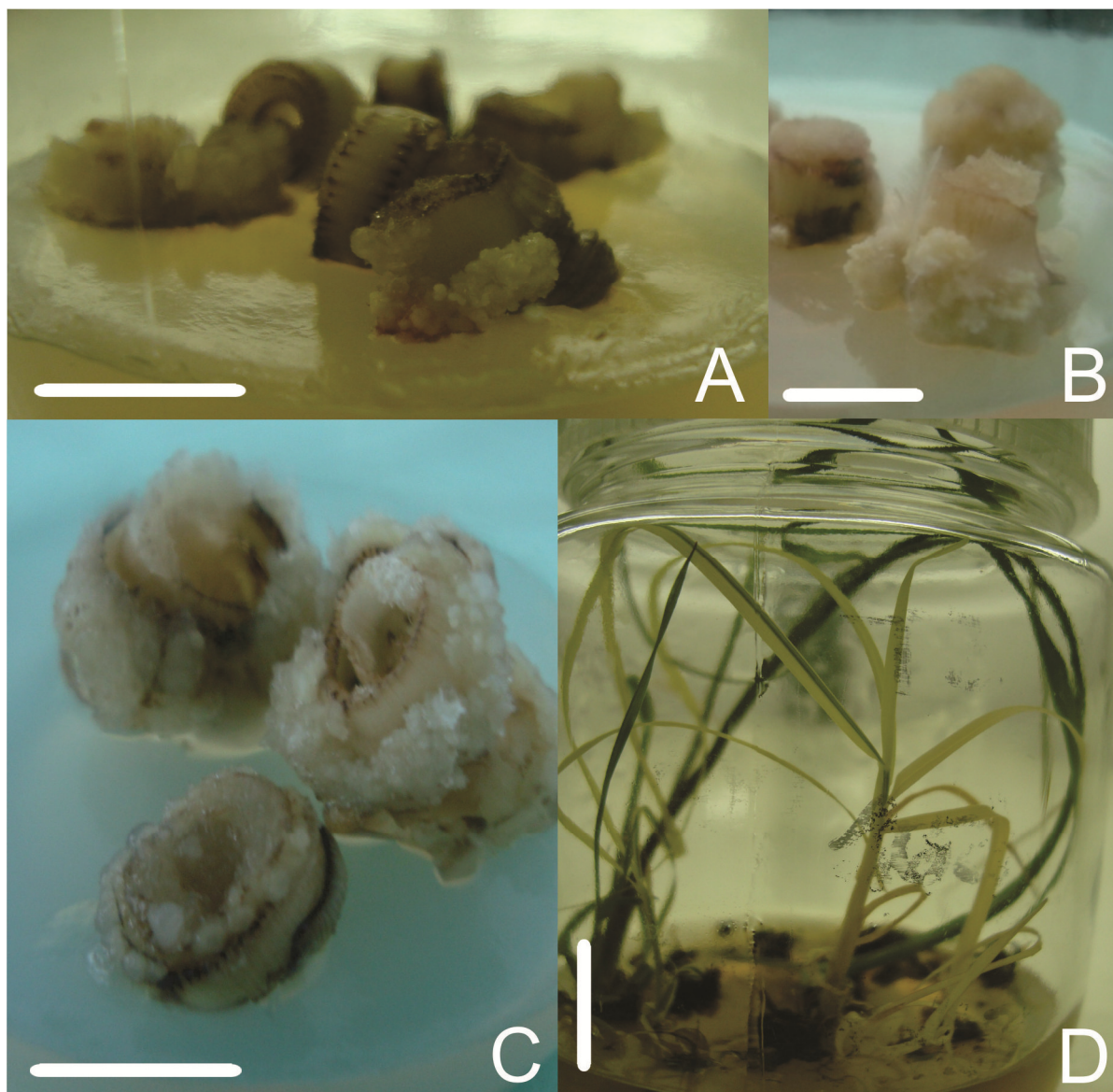


FIGURA 4. Etapas da regeneração do cultivar RB72454. Formação de calos embriogênicos em: meio MS (A), meio MS/2 (B) e meio MS/Fe (C). Desenvolvimento de plântula albina *in vitro* (D). Barra: 1 cm

5.4 CONCLUSÕES

- A redução das concentrações de macro, micronutrientes e vitaminas em meio de cultura (MS/2) em concentração de 9, 16 e 27 μM de 2,4-D, auxilia na formação de calos embriogênicos;
- Meio MS/2 promoveu uma redução da oxidação dos explantes do cultivar RB72454, em todas as concentrações de 2,4-D testadas.

5.5 REFERÊNCIAS

- ARANTES, O.M.N.; AZEVEDO, J.L. A biotecnologia na agropecuária. **Semina**, 7(2):62-87, 1986.
- BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**. Oxford, 2(3):409-416, 1992.
- CARNEIRO, I.F. Adequação de técnicas de cultura *in vitro* de obtenção de mudas de bananeira (*Musa* AAB) cultivar maçã. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1997.
- CONAB. Cana-de-Açúcar. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/boletim_cana_setembro_2010.pdf Arquivo consultado em 15/10/2010.
- COOKE T.J., RACUSEN R.H. AND COHEN J.D. The role of auxin in plant embryogenesis. **Plant Cell**, 5:1494–1495, 1993.
- FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, 4(3):201-205, 1998.
- FALCO, M.C.; TULMANN NETO, A.T.; UILIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **The Plant Cell Reports**. New York, 19:118-1194, 2000.
- GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, 43:27–47, 2004.
- GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene. **Crop Science**, 36:37-40, 1996.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P. D. Plant propagation by tissue culture. Hants : **Exegetics Limited**. p.709, 1984.
- GRATTAPAGLIA, D.E.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH. p.183-260, 1998.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de Biotecnologia**. CCA/UFSC. Edição da Steinmacher. p.41, 2006.
- HEERDT, E. Indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). **Universidade Federal de Viçosa**. MG. p.40, 2008.
- HO, J.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny somatic embryos. **Protoplasma**. 118:169-180, 1983.

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

JOYCE, P.; KUWAHATA, M.; TURNER, N.; LAKSHAMANAN, P. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. **Plant Cell Reports**, 29:173-183, 2010.

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

LAKSHAMANAN, P. Invited review addendum: somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review ‘sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities’. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, 41(4):345–363, 2006.

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. **The Plant Cell Reports**, 23(3):134-143, 2004.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. Melhoramento de cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. Ed. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2 ed. Viçosa, UFV, p.205-251, 1999.

MOLINARI, H.B.C.; MARUR, C.J.; DAROS, E.; CAMPOS, M.K.F; CARVALHO, J.F.R.P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**. 130 (2):218-229, 2007.

MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15:473-479, 1962.

OLIVEIRA, P.D.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de diferentes concentrações do meio MS, nitrogênio e sacarose na micropropagação de crisântemo ‘Orange reagen’. **Bragantia**, Campinas, 55(1):9-18, 1996.

RAJESWARI, S.; THIRUGNANAKUMAR, S.; ANANDAN, A.; KRISHNAMURTHI, M. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and evaluation for quantitative and quality traits. **Euphytica**, 168:71-80, 2009.

RIDESA – Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar. Catálogo Nacional de Variedades “RB” de Cana-de-açúcar – março 2010. Universidade Federal do Paraná, p.136, 2010.

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa* AAB) *in vitro*. I. Concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal – SP, 23(2):225-229, 2001.