

INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE CANA-DE-AÇÚCAR RB996961

Rodrigo de Oliveira Almeida^{1*}; Sérgio Delmar dos Anjos e Silva²; Daiane Peixoto Vargas²;
Leonardo Ferreira Dutra²

SAP 9081 Data envio: 01/12/2013 Data do aceite: 23/03/2014
Scientia Agraria Paranaensis – SAP; ISSN: 1983-1471
Marechal Cândido Rondon, v. 14, n. 3, jul./set., p. 154-159, 2015

RESUMO - A cana-de-açúcar é uma cultura muito plantada no Brasil devido a grande importância econômica de seus produtos, como etanol e açúcar. Sendo assim, a cultura está frequentemente inserida em programas de melhoramento genético. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a resposta morfogênica do genótipo RB996961 à indução de embriogênese somática, com subsequente regeneração dos embriões. Segmentos transversais de 2-3 mm de espessura de folhas jovens oriundas de plantas com 6 a 9 meses de idade foram cultivados em meio MS sólido contendo três concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para indução de calos embriogênicos. Os melhores resultados foram obtidos usando 13,5 ou 31,5 $\mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D em 45 ou 60 dias de incubação em meio de indução, um a três subcultivos e 15 a 45 dias de incubação em meio de regeneração. Este resultado mostra que o protocolo utilizado para o genótipo RB996961 foi eficiente para produção de embriões somáticos (superior a 80%), contudo, necessitando de ajustes na fase de regeneração (62,6 a 73,4%).

Palavras-chave: *Saccharum* spp., cultura de tecido vegetal, embriogênese somática.

Induction and regeneration of somatic embryos of sugarcane RB996961

ABSTRACT - Sugarcane is a crop widely planted in Brazil because of the economic importance of its products, like sugar and ethanol. Thus, the crop is often inserted in breeding programs. Therefore, the aim of this study was to evaluate the morphogenic response to somatic embryogenesis and somatic embryos regeneration for genotype RB996961. Transversal segments of young leave rolls with 2-3 mm size from plants with 6 to 9 months old were subcultured on solid MS medium supplemented with three concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) for embryogenic callus induction. Better results were obtained using 13.5 or 31.5 $\mu\text{M L}^{-1}$ of 2,4-D in 45 or 60 days of incubation on induction medium, one to three subculture and 15 to 45 days of incubation on regeneration medium for genotype RB996961. This results show that the protocol used to genotype RB996961 was efficient to somatic embryos production (over 80%), nevertheless, it is necessary to adjust the regeneration approach (62.3 to 73.4%).

Key words: *Saccharum* spp., plant tissue culture, somatic embryogenesis.

¹MSc. em Biotecnologia Vegetal, Departamento de Agricultura e Ambiente, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Câmpus Rio Pomba, CEP 36180-000, Rio Pomba, MG. E-mail: rodrigooliveiraufv@gmail.com. *Autor para correspondência

²Embrapa Clima Temperado, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Caixa Postal 403, CEP 96001-971, Pelotas, RS

INTRODUÇÃO

Plantada em larga escala comercial nos trópicos e sub-tropicais, a cultura da cana-de-açúcar está presente em vários países (COSTA-LIMA et al., 2001). Devido a sua importância econômica, intensificaram-se os trabalhos desta cultura nos programas de melhoramento vegetal, sendo o Brasil o líder mundial no uso desta cultura como fonte renovável de energia e na exportação de açúcar (CONAB, 2013). Com a expansão da cultura para novas áreas, atualmente é uma das principais culturas em estudo (MOLINARI et al., 2007; PAPINI-TERZI et al., 2009), adaptando-se a diferentes condições ambientais e com uma alta eficiência na produção de biomassa.

Trabalhos com cultura de tecido de cana-de-açúcar tem sido realizados, mostrando que é possível produzir em larga escala mudas saudáveis, complementando a propagação comercial desta cultura em vários países, como Brasil, Estados Unidos, Índia e Cuba (LAKSHMANAN et al., 2006). Entretanto, o protocolo para produção de plantas por cultura de tecido precisa ser eficiente (DESAI et al., 2004).

A propagação *in vitro* pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática (LAKSHMANAN et al., 2006), utilizando cultura de calos (RASHID et al., 2009; ATHER et al., 2009), cultura de folhas imaturas (KHAN et al., 2009; RAMGAREEB et al., 2010) e a cultura de meristema (BURNER; GRISHAM, 1995). Atualmente, a cultura de calos vem sendo amplamente utilizada em programas de transformação genética (SANTOSA et al., 2004; JOYCE et al., 2010; BASNAYAKE et al., 2011).

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliar a resposta morfológica de cana-de-açúcar (cultivar RB996961) à indução de embriogênese somática e sua consequente regeneração.

MATERIAL E MÉTODOS

Conduziu-se o trabalho no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, da Embrapa Clima Temperado. O genótipo RB996961, conduzido no Campo Experimental da Embrapa Clima Temperado, foi utilizado para este experimento. O ápice das plantas com 8 a 9 meses de idade foram coletadas (maio de 2011) no campo de produção, fornecendo o explante a ser utilizado.

As folhas externas foram retiradas, e as folhas jovens foram lavadas com água estéril. Em condições assépticas, as folhas jovens foram desinfestadas com etanol 70% por um minuto e solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos. Adicionalmente, mais folhas foram retiradas, permanecendo a fonte de explante com aproximadamente 1 cm de diâmetro. Logo acima do meristema apical, segmentos transversais de 2-3 mm de espessura foram seccionados, gerando os explantes a serem utilizados. Foram seccionados 15 explantes por ápice para todo experimento.

O meio de indução utilizado neste experimento foi constituído dos sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 20 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 100 mg L⁻¹ de PVP, 0,5 mg L⁻¹ de

ácido nicotínico, 0,15 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 1 mg L⁻¹ de tiamina, 50 mg L⁻¹ de cisteína, 2 mg L⁻¹ de glicina, 50 mg L⁻¹ de arginina, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina e 50 mL L⁻¹ água de coco (MSC3) (HEINZ; MEE, 1969). Três concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético) (4,5; 13,5 e 31,5 µM L⁻¹) foram utilizadas. O pH do meio de indução foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem (121 °C, 1,5 atm por 20 min).

Em seguida, os explantes foram colocados em frascos de 250 mL (contendo 20 mL de meio de indução), selados com tampas de polipropileno e incubados a 26 ± 1°C sob ausência de luz. Os tratamentos consistiam de 12 repetições (total de 36 unidades experimentais por tratamento), contendo seis explantes por repetição (total de 216 explantes por tratamento). Respostas morfológicas dos explantes foram avaliadas em três diferentes tempos (30, 45 e 60 dias), formando assim um fatorial duplo (três concentrações de 2,4-D x três tempos de incubação).

O meio de regeneração utilizado foi composto sais MS contendo 20 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 100 mL L⁻¹ de água de coco. O pH do meio de regeneração foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem (121 °C, 1,5 atm por 20 min).. Aos 45 dias, os calos embriogênicos provenientes do meio de indução de embriogênese somática foram individualizados dos explantes e transferidos para um novo meio de indução (primeiro subcultivo).

Após 21 dias e 42 dias, realizou-se o segundo e terceiro subcultivo, respectivamente. Ao final de cada subcultivo (1º, 2º e 3º subcultivo), os calos embriogênicos subcultivados foram transferidos para o meio de regeneração. A resposta morfológica de regeneração foi avaliada em três diferentes tempos (15, 30 e 45 dias). Cada tratamento consistiu de três repetições, sendo cada repetição contendo quatro amostras de calos embriogênicos (aproximadamente 4 mm² cada amostra) coletadas ao acaso, totalizando 72 amostras para cada tratamento, formando assim um fatorial triplo (2 concentrações de 2,4-D x três subcultivos x três tempos de incubação).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial. Os dados coletados foram transformados ($\arcsen\sqrt{\%/100}$) e analisados por ANOVA (p<0.05), seguido do teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação das médias no *software* R (R Development Core Team, 2009), utilizando o *package* ExpDes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o preparo do material vegetal, segmentos transversais (2-3 mm) foram colocados em meio de indução. Aos 21 dias observou-se resposta morfológica (início de formação de calos) dos explantes no genótipo em estudo (RB996961) nas três concentrações de 2,4-D (4,5, 13,5 e 31,5 µM L⁻¹ de 2,4-D).

A análise de variância (ANOVA) mostrou que houve diferença significativa no tempo e na concentração utilizada do fitorregulador 2,4-D para indução de calos embriogênicos. Não houve diferença significativa para a regeneração dos embriões somáticos provenientes dos

diferentes meios de indução. Não houve diferença significativa para a regeneração dos embriões somáticos em relação ao tempo de incubação em meio de regeneração, número de subcultivos e em relação aos embriões somáticos provenientes dos diferentes meios de indução.

A produção de calos embriogênicos em relação às três concentrações de 2,4-D testadas (independente do tempo de incubação) obteve melhores resultados utilizando

13,5 e 31,5 $\mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D em meio de indução (81,7 e 86,3%, respectivamente). Para a concentração de 4,5 $\mu\text{M L}^{-1}$, houve produção de 39,2% de calos embriogênicos (Figura 1). Para a produção de calos embriogênicos ao longo do tempo (independente da concentração de 2,4-D), os melhores resultados foram obtidos aos 45 e 60 dias de incubação em meio de indução (75,2%, para ambos os tempos). Para o tempo de 30 dias, a produção de calos embriogênicos alcançou uma taxa de 56,8% (Figura 2).

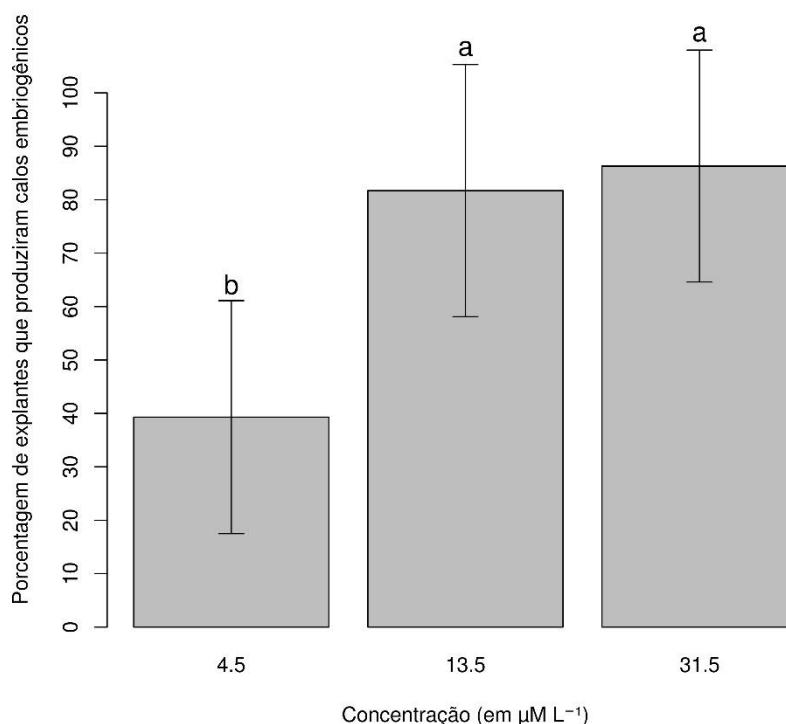


FIGURA 1 - Efeito das diferentes concentrações do fitorregulador 2,4-D em meio de indução na produção de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (cultivar RB996961). Comparação das médias de explantes que produziram calos embriogênicos em função da concentração de 2,4-D. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si (Tukey, $p=0,05$).

Tabela 1. Regeneração de embriões somáticos de cana-de-açúcar em meio de regeneração.

Concentração	Porcentagem de embriões somáticos regenerados				
		Subcultivo		Tempo	
13,5	63,7 ± 31,1 ns	1	67,8 ± 26,7 ns	30	73,4 ± 28,9 ns
31,5	72,0 ± 23,2 ns	2	67,8 ± 26,7 ns	45	62,6 ± 22,9 ns
		3	67,8 ± 30,6 ns	60	67,9 ± 30,6 ns

*- Ns – diferença não significativa.

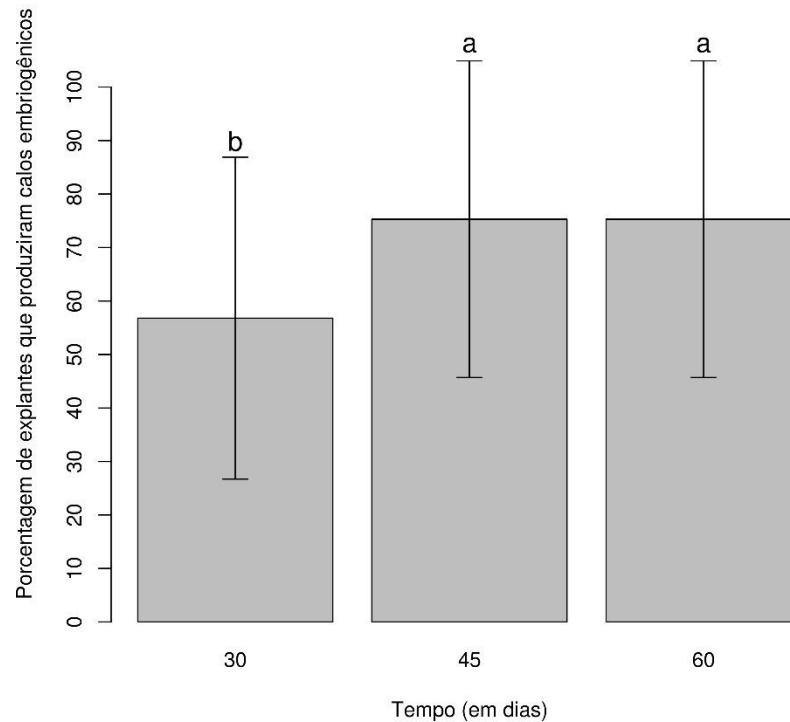


FIGURA 2 - Efeito dos diferentes tempos de incubação em meio de indução suplementado com fitorregulador 2,4-D na produção de calos embriogênicos em cana-de-açúcar (cultivar RB996961). Comparação das médias de explantes que produziram calos embriogênicos em função do tempo de incubação em meio de indução. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si (Tukey, $p=0,05$).

A ocorrência de formação de calo embriogênico nos três tratamentos se deve a presença do regulador de crescimento 2,4-D, ao passo que este processo não ocorreu no controle negativo (meio basal sem 2,4-D). Os resultados aqui encontrados são similares aos resultados relatados por Ho e Vasil (1983), onde estes autores estudaram a embriogênese somática em cana-de-açúcar do clone 68-1067. A embriogênese primária em cana-de-açúcar é exclusivamente induzida em meio de cultura contendo auxinas, como o 2,4-D, e são essenciais para induzir a formação de calos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990). Amplamente utilizado na indução de calos e embriões somáticos, o regulador de crescimento 2,4-D quando aplicado em concentrações elevadas produz calos que se apresentam com um aspecto mais mucilaginoso (HO; VASIL, 1983; GARCIA et al., 2007).

Os resultados contidos neste trabalho mostram com clareza que a formação de calos embriogênicos relaciona-se diretamente com a concentração do fitorregulador 2,4-D e o tempo de incubação no meio de indução, apresentando assim diferentes taxas de produção de calos embriogênicos. Esses resultados corroboram o

que foi mostrado por Ho e Vasil (1983) e Desai et al. (2004), sendo que estes últimos descrevem esse fenômeno no genótipo CoC-671, plantada na Índia.

Após 45 dias em meio de indução, os calos produzidos pelos explantes foram individualizados e transferidos para um novo meio de indução (1º subcultivo). Após 21 dias e 42 dias, realizou-se o segundo e terceiro subcultivo, respectivamente. A resposta morfológica de regeneração foi avaliada ao final de cada subcultivo e em três diferentes tempos (15, 30 e 45 dias).

Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na regeneração dos embriões quanto ao número de subcultivos, concentração de 2,4-D utilizado na origem dos embriões somáticos e ao tempo de regeneração para o genótipo RB996961 (Tabela 1).

Calos embriogênicos provenientes do meio de indução contendo $4,5 \mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D não se desenvolveram na fase de subcultivo, oxidando-se em poucos dias após a individualização e consequentemente sendo retirados da avaliação de regeneração de embriões.

A ocorrência desse fato pode ser explicada com base em estudos prévios. Na regeneração de brotos

proveniente de embriões somáticos, a sacarose pode influenciar a diferenciação celular e no desenvolvimento das raízes, assim como os complexos orgânicos e aminoácidos essenciais no meio de regeneração (HO; VASIL, 1983). Segundo Mudry et al. (2013), a insuficiência na maturação dos embriões somáticos acarreta em desenvolvimento não satisfatório na produção de brotos. Esse fenômeno é chamado de germinação precoce e é o principal problema no desenvolvimento de embriões somáticos (JIMÉNEZ, 2005)).

O uso de água de coco, que contém citocininas naturais, em meio de regeneração promove efeitos benéficos à morfogênese e desenvolvimento do broto (GEORGE et al., 2008). Contudo, a concentração dos compostos da água de coco não é constante nos frutos, ou mesmo nos produtos industrializados, podendo assim levar a variações na taxa de regeneração de embriões somáticos. Contudo, no presente trabalho não houve variação na taxa de regeneração, podendo ser explicado pela utilização de água de coco proveniente de produto industrializado pertencente a um único lote de fabricação.

Assim como nos trabalhos de Snyman et al. (2006), os brotos regenerados provenientes de embriões somáticos foram produzidos neste experimento usando meio de regeneração sob ausência de auxina.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a micropropagação por embriogênese somática do genótipo RB996961 se mostra viável. Entretanto, ajustes na fase de regeneração dos embriões somáticos são necessários, para assim obter uma maior produção de plantas que poderão suprir às necessidades dos programas de melhoramento genético desta espécie.

CONCLUSÕES

A micropropagação do genótipo RB996961 (86,3% de produção de calos embriogênicos e 72,0% de regeneração dos embriões somáticos) obteve melhores resultados incubando os explantes por 45 ou 60 dias em meio de indução contendo 13,5 ou 31,5 $\mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D, podendo realizar de um a três subcultivos e incubando por 15 a 45 dias em meio de regeneração.

O protocolo utilizado para indução de embriogênese somática e regeneração dos embriões formados para o genótipo estudado foi eficiente para produção de embriões somáticos, entretanto necessita-se de ajustes na fase de regeneração, de modo aumentar a quantidade de mudas formadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATHER, A.; KHAN, S.; REHMAN, A.; NAZIR, M. Optimization of the protocols for callus induction, regeneration and acclimatization of sugarcane cv. Thatta-10. *Pakistan Journal of Botany*, v.41, n.2, p.815-820, 2009.

- BASNAYAKE, S.W.V.; MOYLE, R.; BIRCH, R.G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. *Plant Cell Reports*, v.30, n.3, p.439-448, 2011.
- BURNER, D.M.; GRISHAM, M.P. Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane as affected by propagation procedure. *Crop Science*, v.35, n.3, p.875-880, 1995.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Central de informações agropecuárias: safras - cana**. São Paulo: CONAB, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_29_31_boletim_cana_portugues_abril_2013_1o_lev.pdf >. Acesso em: 10 abr. 2013.
- COSTA LIMA, M.A.; 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*, v.24, n.1, p.73-77, 2001.
- DESAI, N.S.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Current Science*, v.87, n.6, p.764-768, 2004.
- 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 on growth regulator. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.90, n.2, p.181-190, 2007.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture** (3rd ed.) Amsterdam: The Background Springer, 2008, v.1, p.501.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, p.99-169, 1990.
- HEINZ, D.J.; MEE, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Science*, v.9, p.346-348, 1969.
- HO, W.J.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*, v.118, n.3, p.169-180, 1983.
- JIMÉNEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, v.47, n.2-3, p.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 Report*, v.29, n.2, p.173-183, 2010.
- KHAN, I.A.; DAHOT, M.U.; SEEMA, N.; YASMEEN, S.; BIBI, S.; RAZA, G.; KHATRI, A.; NAQVI, M.H. Direct regeneration of sugarcane plantlets: a tool to unravel genetic heterogeneity. *Pakistan Journal of Botany*, v.41, n.2, p.797-814, 2009.
- LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; WANG, L.; ELLIOT, A.; GROF, C.P.L.; BERDING, N.; SMITH, G.R. Development and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. Interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Report*, v.25, n.10, p.1007-1015, 2006.
- MOLINARI, H.B.C., MARUR, C.J., DAROS, E., DE CAMPOS, M.K.F., DE CARVALHO, J.F.R.P., FILHO, J.C.B., 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*, v.130, n.2, p.218-229, 2007.
- MUDRY, C.S.; SOUZA, D.K.K.; DIBAX, R.; ALCÂNTARA, G.B.; BESPALHOK FILHO, J.C. Embriogênese somática da cultivar RB966928 e do clone RB986419 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Semina: Ciências Agrárias, v.34, n.3, p.1023-1032, 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.2, p.473-497, 1962.
- PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VÊNCIO, R.Z.N.; FELIX, J.M.; BRANCO, D.S.; WACLAWOVSKY, A.J.; DEL BEM, L.E.V.; LEMBKE, C.G.; COSTA, M.D.L.; NISHIYAMA JR, M.Y.; VICENTINI, R.; VINCENTZ, M.G.A.; ULIAN, E.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics*, v.21, p.1-21, 2009.

- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 fev 2011.
- RAMGAREEB, S.; SNYMAN, S.J.; VAN ANTWERPEN, T.; RUTHERFORD, R.S. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp.cultivar NCo376) using apical meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, p.175-181, 2010.
- RASHID, H.; ALI KHAN S.; ZIA, M.; CHAUDHARY, M. F.; HANIF Z.; CHAUDARY, Z. Callus induction and regeneration in elite sugarcane cultivar hsf-240. **Pakistan Journal of Botany**, v.41, n.4, p.1645-1649, 2009.
- SANTOSA, D.A.; HENDROKO, R.; FAROUK, A.; GREINER, R.A. rapid and highly efficient method for transformation of sugarcane callus. **Molecular Biotechnology**, v.28, n.2, p.113-120, 2004.
- SNYMAN, S.J.; MEYER, G.M.; RICHARDS, J.M.; HARICHARAN, N.; RAMBAREEB, S.; HUCKETT, B.I. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disk explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Report**, v.25, n.10, p.1016-1023, 2006.