

COMPORTAMENTO *IN VITRO* DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR IAC

ISABELLE OLIVEIRA¹; ALEXANDRE P. B. BOER²; CAMILA S. FESTUCCI²;
DÉBORA M. SANSOLI²; SILVANA CRESTE³

Nº 11151

RESUMO

A micropropagação em larga escala de variedades de cana-de-açúcar a partir de discos foliares constitui-se uma metodologia promissora, porém ainda pouco explorada. Para tanto, inicialmente é necessária uma avaliação individual de cada genótipo candidato, com a finalidade de se verificar a sua capacidade de regeneração e propagação, bem como a sua estabilidade *in vitro*. Além disso, a obtenção de plantas geneticamente modificadas, também requer uma análise prévia do comportamento desses genótipos no que se refere à capacidade de formação de calos embriogênicos, pois eles constituem a principal fonte de material vegetal para a transformação genética em cana-de-açúcar. Assim, este trabalho teve o objetivo de avaliar a capacidade de regeneração e também de formação de calos embriogênicos, em 9 genótipos de cana-de-açúcar pertencentes ao Progamma Cana IAC. Discos foliares provenientes de plantas saudáveis mantidas em campo, com idade entre 6 a 12 meses, foram introduzidos em meio de cultura apropriado e cultivados *in vitro*. Os resultados revelaram que todos os nove (09) genótipos avaliados foram capazes de regenerar novas plantas a partir dos discos foliares introduzidos. Paralelamente, a capacidade de formação de calos embriogênicos e a regeneração dos mesmos foi também avaliada. Sete (07) dos nove (09) genótipos analisados foram capazes de produzir calos embriogênicos, havendo genótipos com altas (~67%), médias (~46%) e baixas (~14%) capacidades de regeneração. Assim, pudemos identificar os genótipos mais promissores para uma futura transformação genética. A utilização em meio de cultura dos compostos prolina, cinetina e caseína hidrolisada, não contribuiu para melhorar a qualidade dos calos produzidos em dois genótipos testados.

ABSTRACT

The large-scale micropropagation of sugarcane varieties from leaf rolls is a methodology promising, but, yet, few explored. An initial evaluation of genotypes concerning to their regeneration capacity and in vitro stability is required. Moreover, the production of genetically modified plants also requires a prior analysis of the behavior of these genotypes in vitro with regarding to their ability to produce embryogenic callus, since these are the main source of plant material for sugarcane genetic transformation. Thus, this study aimed to evaluate the capacity of regeneration and callus formation in nine sugarcane genotypes belonging to "Programa Cana IAC". Leaf rolls obtained from healthy plants kept on field, with 6 - 12 months age were introduced in appropriate culture medium and cultivated in vitro. The results revealed that all nine genotypes were able to regenerate new plants from leaf rolls. These, seven were able to produce embryogenic callus, existing genotypes with high (~67%) medium (~46%) and low (~ 14%) capacity of callus regeneration. Thus, it was possible to identify genotypes more promising for genetic transformation. The use of culture medium containing proline, cinetine and casein hydrolyzate did not contribute to improve the quality of the callus produced in two genotypes tested

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica no Brasil e no mundo. Ela vem sendo cultivada em regiões tropicais e subtropicais em diversos países do mundo, sendo o Brasil o seu maior produtor, com cerca de 570 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 6,7 milhões de hectares (FAO, 2009; FNP, 2010; UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – ÚNICA, 2010).

O melhoramento genético clássico atua como o principal responsável pela produção e incorporação de diversas características de interesse agrônomo nas variedades atuais de cana-de-açúcar. No entanto, o aumento da demanda por novos e promissores materiais vegetais, que gerem ganhos na produtividade, aliado às limitações no progresso do melhoramento genético nesta cultura (ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998), promovem cada vez mais a ascensão de ferramentas biotecnológicas, tais como a transformação genética.

Em todo o mundo, os programas de melhoramento genético buscam obter cultivares mais produtivas, exibindo tolerância a fatores bióticos e abióticos, de modo a se extrair o máximo potencial da cultura sob condições ambientais específicas. Avanços recentes nas técnicas de biologia molecular e transformação genética tem possibilitado a identificação, o isolamento e a transferência de genes desejáveis para o genoma da cana-de-açúcar (BUTTERFIELD et al., 2002), apresentando-se como importante complemento aos métodos convencionais de melhoramento desta cultura.

A transformação genética vegetal, por sua vez, é um procedimento dependente de um sistema eficiente de regeneração e multiplicação das plantas *in vitro*, e a cana-de-açúcar é uma cultura que possui um sistema bem estabelecido. No entanto, devido a sua natureza complexa e poliploide, muitos genótipos apresentam instabilidades quando submetidos a sucessivos ciclos de cultivo *in vitro*, gerando algumas anomalias morfofisiológicas conhecidas como variações somaclonais. (GALLO-MEAGHER & IRVINE, 2000). Além disso, em cana-de-açúcar, a aplicação da transgenia esbarra na forte dependência do genótipo em gerar calos embriogênicos viáveis e com bom potencial de transformação.

Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de regeneração, a estabilidade e o comportamento *in vitro* de nove genótipos de cana-de-açúcar em fase final de melhoramento pelo Programa Cana IAC, bem como sua capacidade de formação e regeneração de calos embriogênicos, visando à

identificação de genótipos promissores para o desenvolvimento futuro de variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificada.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: Nove (09) genótipos de cana-de-açúcar pertencentes ao Programa Cana IAC foram introduzidos *in vitro*: IACSP02-3174; IACSP01-6444; IACSP01-2433; IACSP01-2430; IACSP01-8082; IACSP96-7603; IACSP98-5012; IACSP99-1020; IACSP99-2072.

Preparo dos explantes: ponteiros de cada genótipo com idade entre 9 a 12 meses foram coletados no campo e levados para o laboratório, removendo-se as duas camadas mais externas de folhas. Estes foram levados ao fluxo laminar e desinfetados com etanol 70% por 10 minutos. Após, foram retiradas sucessivas camadas de folhas até expor o palmito, contendo 5-6 folhas enroladas. A seguir, cada palmito foi cortado em discos transversais, com espessura de 1-2 mm, e colocado em meio apropriado para regeneração direta de plantas ou para formação de calos embriogênicos. Para regeneração, os discos foliares foram colocados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado 7g l⁻¹ ágar, 0,15g l⁻¹ ácido cítrico, 5mg l⁻¹ ácido naftalenoacético (ANA) e, 5mg l⁻¹ de cinetina (Kin), conforme proposto por Gill et al., (2006). Os frascos foram deixados por 3-4 dias no escuro, e depois incubados a 26 ± 1°C sob fotoperíodo de 16 h, com densidade de fluxo de fótons de 30 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A cada duas semanas, as culturas foram transferidas para meio fresco. Após, as plântulas foram subcultivadas em meio MS líquido de multiplicação, suplementado com 20g de sacarose, 0,9uM Benzilamino purina (BAP) e 0,46uM de Cinetina (Kin), trocando-se o meio a cada 2 semanas, por 5 subcultivos. Posteriormente, as plantas foram enraizadas em meio MS contendo 40 g l⁻¹ de sacarose, 10 μM ANA por 15 dias.

Para produção de calos, utilizou-se o meio MS acima descrito, seguido da adição de 20ml/L de água de côco e 3mg/L de 2,4 D (Dichlorophenoxyacetic acid) como fonte exclusiva de hormônio. Os frascos contendo os discos foram colocados no escuro para indução dos calos, com subcultivos a cada 21 dias, por 90 dias. Após, estes foram transferidos para meio sólido na mesma composição descrita para discos foliares, para diferenciação em plantas.

Paralelamente, um experimento com as cultivares IACSP95-5000 e IACSP96-3060, foi realizado adicionando-se ao meio de cultura, compostos citados na literatura,

capazes de melhorar a quantidade e a qualidade dos calos embriogênicos. Esses dois genótipos já foram avaliados anteriormente quanto a capacidade de formar calos embriogênicos, sendo que a cultivar IACSP95-5000 caracterizada como de alta capacidade e a IACSP96-3060 de baixa capacidade. Os seguintes tratamentos foram aplicados:

Controle: meio MS + 3mg/L 2,4D

T1= meio MS + 1mg/L 2,4D

T2 = meio MS + 2mg/L 2,4D

T3 = meio MS + 4mg/L 2,4D

T4= meio MS + 3mg/L 2,4D + 250mg/L Prolina

T5 = Meio MS + 3mg/L 2,4D + 500mg/L Prolina

T6 = meio MS + 3mg/L 2,4D + 750 mg/L Prolina

T7 = meio MS + 3mg/L 2,4D + 0,5 mg/L Cinetina

T8 = meio MS + 3mg/L 2,4D + 500 mg/L Caseína Hidrolisada

T9 = meio MS + 3mg/L 2,4D + 1500 mg/L Caseína Hidrolisada

T10 =meio MS + 3mg/L 2,4D + 2000 mg/L Caseína Hidrolisada

*Os tratamentos foram mantidos no escuro, como descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Regeneração de plantas de cana-de-açúcar a partir de discos foliares: todos os nove genótipos testados para capacidade de regeneração direta produziram plantas completas *in vitro* (Tab. 1), porém, a intensidade de regeneração foi influenciada pelo genótipo, tendo-se identificado genótipos com alta (IACSP96-7603), média (IACSP01-6444) e baixa (IACSP99-2072) intensidade de regeneração.

Porém, para todos os genótipos, a multiplicação em escala via disco foliar é altamente viável, visto que é possível obter, após cinco subcultivos, milhares de plantas provenientes de um único explante, corroborando com as idéias de LAKSHMANAN, 2006. Além disso, não foi verificada a ocorrência de variação somaclonal em nenhum dos nove (09) genótipos micropropagados.

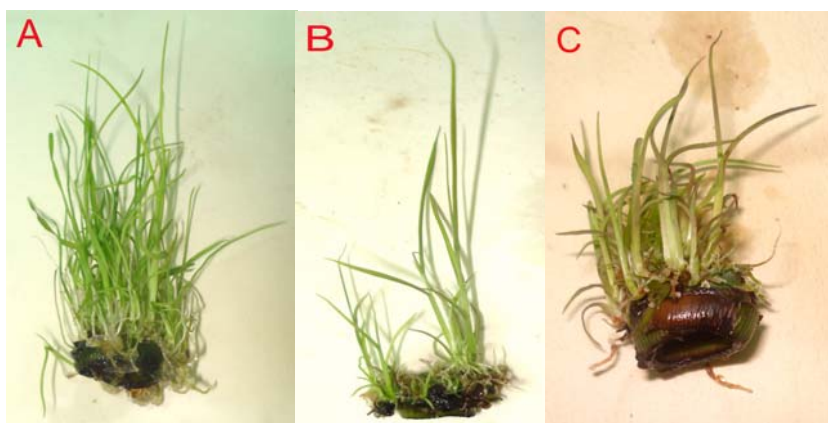


Figura 1 - Regeneração de plantas de cana-de-açúcar a partir de discos foliares.

IACSP 96-7603 (1A); IACSP 01-6444 (1B); IACSP 99-2072 (1C) com alta, média e baixa regeneração respectivamente

Resposta dos genótipos quanto à produção de calos embriogênicos: A produção de calos embriogênicos é uma etapa fundamental para a transformação genética da cana-de-açúcar, seja por métodos diretos (*Agrobacterium tumefaciens*) ou indiretos (Biolística). No entanto, a capacidade de regeneração dos calos é altamente dependente do genótipo, daí a necessidade de se conhecer o potencial daqueles materiais mais promissores para transformação genética. Dos nove (09) genótipos avaliados, sete (07) foram capazes de gerar calos embriogênicos (Tab. 1). Porém, a quantidade e qualidade dos calos produzidos também foi altamente dependente do genótipo (Fig. 2). Assim, pôde-se verificar que os genótipos IACSP 96-7603, IACSP 01-6444 e IACSP 98-5012, foram os que produziram calos embriogênicos em maior quantidade e melhor qualidade. Além disso, foram também aqueles que apresentaram as maiores taxas de regeneração a partir dos calos formados (Fig. 3): 67%, 46% e 14%, respectivamente (Tab. 2). Assim, tais genótipos foram considerados os mais promissores para serem utilizados em experimentos futuros de transformação genética de cana-de-açúcar.

Tabela 1. Capacidade de regeneração a partir de discos foliares (A) e formação de calos embriogênicos (B) em genótipos de cana-de-açúcar IAC.

Genótipo	A-) Disco Foliar	B-) Calo Embriogênico
IACSP 01-2430	✓	✓
IACSP 98-5012	✓	✓
IACSP 01-8082	✓	✓
IACSP 99-2072	✓	✓
IACSP 02-1305	✓	-
IACSP 02-3174	✓	-
IACSP 01-2433	✓	✓
IACSP 96-7603	✓	✓
IACSP 01-6444	✓	✓



Figura 2 - Observação de calos embriogênicos de nos genótipos IACSP 96-3174(2A); IACSP 95-6444 (2B) e IACSP 96-7603 (2C) respectivamente.

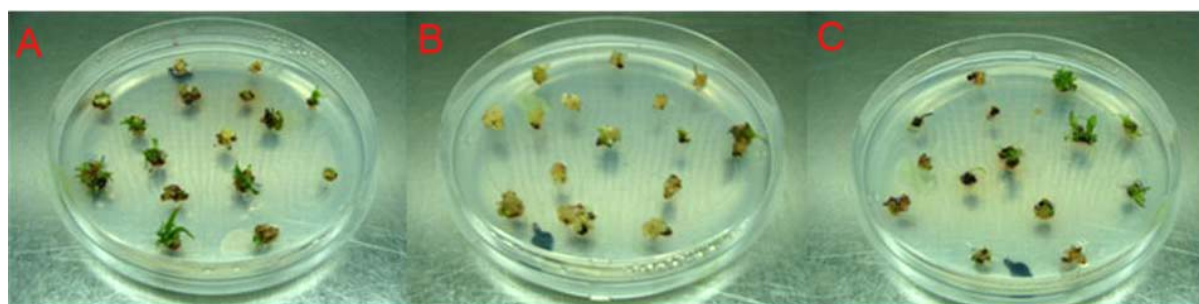


Figura 3. Regeneração de calos embriogênicos em genótipos IAC. A: IACSP 96-7603; B: IACSP 95-6444; C: IACSP 98-5012.

Tabela 2. Percentual de regeneração de plântulas a partir de calos embriogênicos em genótipos IAC.

Genótipo	(%) Regeneração / Calos
IACSP 01-2430	26 %
IACSP 98-5012	40 %
IACSP 01-8082	27 %
IACSP 99-2072	18 %
IACSP 02-1305	0 %
IACSP 02-3174	0 %
IACSP 01-2433	46 %
IACSP 96-7603	67 %
IACSP 01-6444	46 %

Influência dos tratamentos testados: diferentes compostos descritos como possíveis indutores da formação de calos embriogênicos foram adicionados ao meio de cultura e testados nas cultivares IACSP95-5000 e IACSP96-3060. A comparação com o tratamento controle revelou que nenhum dos compostos testados foi capaz de melhorar a qualidade e o aspecto dos calos produzidos. Pelo contrário, todas as concentrações de Prolina utilizadas determinaram a produção de calos extremamente hidratados e escurecidos, e interferiram negativamente na qualidade dos calos obtidos. Uma exceção positiva foi observada para os tratamentos T1 e T2 (com 1 e 2 mg/L de 2,4 D respectivamente), os quais não diferiram visualmente do tratamento controle (3mg/L 2,4D) em relação à quantidade e qualidade dos calos. Assim, uma redução na concentração hormonal de auxinas sintéticas, tais como o 2,4 D, na produção de calos pode ser desejada em cana-de-açúcar, visto que contribui para a redução da ocorrência de instabilidades genéticas e, conseqüentemente, da variação somaclonal durante a fase *in vitro* dos experimentos de transformação genética.

CONCLUSÃO

Todos os nove genótipos testados podem ser multiplicados *in vitro* a partir de discos foliares como fonte de explante.

A produção de calos embriogênicos visando à transformação genética mostrou-se altamente dependente do genótipo, tendo-se identificado três (03) genótipos mais promissores para transformação: IACSP 96-7603, IACSP 95-6444 e IACSP 01-2433.

A adição dos compostos Prolina, Cinetina e Caseína Hidrolisada nas concentrações testadas para as cultivares IACSP95-5000 e IACSP96-3060 não contribuiu para melhorar a quantidade e qualidade dos calos produzidos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao IAC – Instituto Agrônomo – Centro de Cana-de-açúcar, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUTTERFIELD, M.K.; IRVINE, J.E.; GARZA, M.V.; MIRKOV, T.E.; Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, p. 797-803, 2002.

ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G.A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.I.; PRIETO-SAMSÓNOV, D.L.; RIVA, G.A. de la; SELMANHOUSEIN, G. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by Agrobacterium-mediated transformation. **Planta**, v.206, p.20-27, 1998.

FAO. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>

FALCO, M.C.; TULMANN NETO, A..T.; ULIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian to sugarcane. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 1188-1194, 2000.

FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A.; GLORIA, B.A. da. Histological characterization of *in vitro* regeneration Saccharum SP. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 9, p. 93-97, 1996.

GALLO-MEAGHER, M.; ENGLISH, R.G.; ABOUZID, A. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.36, p.37-40, 2000.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane: an addendum to the invited review 'sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, Oxon, v. 41, n. 4, p. 345-363,2006.