



CARLOS QUEIROZ PELAIO

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO *IN*
VITRO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)
GENETICAMENTE MODIFICADA**

**LAVRAS - MG
2023**

CARLOS QUEIROZ PELAIO

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) GENETICAMENTE MODIFICADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Evandro Novaes
Orientador

**LAVRAS - MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pelaio, Carlos Queiroz.

Otimização de protocolo de multiplicação *in vitro* de
cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) geneticamente modificada /
Carlos Queiroz Pelaio. - 2023.

50 p.

Orientador(a): Evandro Novaes.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade
Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Multiplicação *in vitro*. 3.
Biorreator. I. Novaes, Evandro. II. Título.

CARLOS QUEIROZ PELAIO

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) GENETICAMENTE MODIFICADA**

**OPTIMIZATION OF *IN VITRO* MULTIPLICATION PROTOCOL OF
GENETICALLY MODIFIED SUGARCANE (*Saccharum spp.*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de janeiro de 2023.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA
Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani	UFLA
Dra. Aparecida Leonir da Silva	CTC

Prof. Dr. Evandro Novaes
Orientador

**LAVRAS - MG
2023**

Dedico ao meu marido, Felipe Calzado, e
minha família por todo amor e apoio nessa
jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amor, Felipe Calzado, por todo apoio, companheirismo, paciência, incentivo e dedicação a nossa família.

A minha família Marlene, Carina e Milene por me incentivarem e me apoiarem incondicionalmente.

A minha segunda família Wilson, Cláudia, Raquel e Gabriel, por me acolherem tão bem e torcerem pelo sucesso da minha jornada.

Ao CTC, principalmente minha liderança Samantha Abbad, por acreditar em mim e dar todo suporte para desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, em especial Ana Carolina e Letícia, que me auxiliaram e me apoiaram nessa jornada.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e aos professores do mestrado profissional pelo conhecimento transmitido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas - Mestrado Profissional.

Aos colegas do mestrado profissional pela troca de conhecimentos e de experiências.

Ao meu orientador, Evandro Novaes, pelo incentivo, ensinamentos e apoio nessa jornada.

Muito obrigado!

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas do Brasil. Responsável pela maior fonte de açúcar do mundo, também é importante fonte alternativa de combustíveis fósseis, por meio do etanol. O melhoramento a partir de técnicas de engenharia genética traz um impacto significativo no campo da agricultura e produção industrial, principalmente no controle de pragas, doenças e modificações fisiológicas. Entretanto, após a geração de plantas geneticamente modificadas, poucos protocolos de propagação *in vitro* são adaptados para fontes de explante provenientes de transformação genética. Além disso, os processos de multiplicação *in vitro* podem acarretar risco de variação fenotípica/somaclonal devido ao longo tempo de exposição em cultura de tecidos. Assim, neste trabalho foram investigadas quatro principais etapas do processo: início da propagação vegetativa, estabelecimento do explante, fase de biorreator de imersão temporária e enraizamento. Por meio dos parâmetros testados nos experimentos foi otimizado um protocolo para a multiplicação *in vitro* de cana-de-açúcar, utilizando tubo Falcon de 50 mL como container do material propagado nas etapas de início e estabelecimento do explante. Após, foi investigado técnicas de manejo como poda e limpeza e programações otimizadas de imersão, permanência de meio de cultura e intervalo de troca na fase de biorreator. Na etapa de enraizamento, obteve-se melhores resultados com meio de cultura contendo 20 g/L de sacarose e regulador de crescimento ANA, além do desmembramento das plântulas para absorção de nutrientes. Com a otimização do protocolo estabelecido houve uma redução do tempo de processo de 20 para 15 semanas, equivalendo a um ganho de 25% em relação ao tempo de cultivo *in vitro* do protocolo original.

PALAVRAS-CHAVE: Cana-de-açúcar. Multiplicação *in vitro*. Biorreator. Organismo Geneticamente Modificado.

ABSTRACT

Sugarcane is one of the main agricultural crops in Brazil. Responsible for the largest source of sugar in the world, it is also an important alternative source of fossil fuels, through ethanol. The improvement through genetic engineering techniques brings a significant impact in the fields of agriculture and industrial production, mainly in the control of pests, diseases and physiological changes. However, after generating genetically modified plants, few *in vitro* propagation protocols are adapted to explant sources from genetic transformation. In addition, *in vitro* multiplication processes may carry a risk of phenotypic/somaclonal variation due to the long exposure of plants in tissue culture. Thus, in this work, four main stages of the process were investigated: beginning of vegetative propagation, explant establishment, temporary immersion bioreactor phase and rooting. Through the parameters tested in the experiments, a protocol for the *in vitro* multiplication of sugarcane was optimized, using a 50 mL Falcon tube as a container for the propagated material in the stages of initiation and establishment of the explant. Afterwards, management techniques such as pruning and cleaning and optimized immersion schedules, culture medium permanence and change interval in the bioreactor phase, and establishment in the rooting stage of the culture medium composed of 20 g/L of sucrose and ANA growth regulator, in addition to seedling dismemberment for nutrient absorption. With the optimization of the established protocol, there was a reduction in the process time from 20 to 15 weeks, equivalent to a 25% gain in relation to the *in vitro* culture time of the original protocol.

KEYWORDS: Sugarcane. *In vitro* multiplication. Bioreactor. Genetically Modified Organism.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meio de cultura de multiplicação <i>in vitro</i> de explantes de cana-de-açúcar.....	23
Tabela 2 - Tratamentos avaliados na primeira fase de multiplicação.....	24
Tabela 3 - Tratamentos a serem avaliados no experimento 2.....	25
Tabela 4 - Tratamentos com diferentes tempos nos parâmetros testados no biorreator do experimento 3	25
Tabela 5 - Tratamentos a serem avaliados na etapa de enraizamento	27
Tabela 6 - Parâmetros qualitativos para avaliação das raízes no final da fase de enraizamento	28
Tabela 7 - Resultado da ANOVA avaliando se o container e a aeração do meio de cultura afetam o número de plantas provenientes do experimento 1.....	29
Tabela 8 - Resultado da ANOVA do experimento 2, avaliando os efeitos da poda e limpeza do material no número de plantas multiplicadas	31
Tabela 9 - Resultado da ANOVA do número de plantas provenientes do experimento 3, avaliando os parâmetros do BIT	33
Tabela 10 - Resultado da ANOVA com os efeitos dos tratamentos do experimento 4 na qualidade das raízes formadas.	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Porção de cana-de-açúcar.....	18
Figura 2 - Plantas controle (não-OGM) prontas para iniciarem a etapa da multiplicação <i>in vitro</i>	22
Figura 3 – Diferentes tipos de containers utilizados no experimento 1 para verificar seus efeitos no início do processo de multiplicação <i>in vitro</i>	29
Figura 4 – <i>Boxplots</i> com a distribuição do número de plantas obtido em cada tratamento do experimento 1	30
Figura 5 – <i>Boxplots</i> com a distribuição do número de plantas obtido nos diferentes tratamentos do experimento 2	32
Figura 6 – Plântulas de cana-de-açúcar retiradas com seis semanas após o início da fase de multiplicação <i>in vitro</i> via biorreator de imersão temporária para realização da poda e limpeza do material	33
Figura 7 – <i>Boxplots</i> com a distribuição do número de plantas obtido nos tratamentos do experimento 3	34
Figura 8 – <i>Boxplots</i> com as distribuições da qualidade das raízes obtidas no experimento 4 após 15 semanas do início de multiplicação <i>in vitro</i>	36
Figura 9 – Biorreator no final do processo de multiplicação <i>in vitro</i> (doze semanas) e início do enraizamento, demonstrando que a densidade das plantas pode prejudicar a formação de raízes no material	37
Figura 10 – Raízes formadas após três semanas do início da etapa de enraizamento em biorreator	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	A cultura da cana-de-açúcar.....	14
2.2	Formas de propagação	16
2.3	Sistema convencional de produção de mudas	17
2.4	Multiplicação <i>in vitro</i>	20
3	OBJETIVO	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Experimento 1	23
4.2	Experimentos 2 e 3.....	24
4.3	Experimento 4	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1	Estabelecimento do explante e início da propagação vegetativa	28
5.2	Fase de Biorreator de Imersão Temporária (BIT)	31
5.3	Enraizamento	35
6	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	APÊNDICE A.....	45

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é utilizada como principal matéria-prima na fabricação de açúcar, correspondendo a 75% da produção mundial (HENRY; KOLE, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2015). O Brasil, responsável por 40% da produção de açúcar do mundo (ARAÚJO *et al.*, 2013), produziu na safra 2021/2022 cerca de 523 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que gerou 32 milhões de toneladas de açúcar e 28 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2021). Na mesma safra o plantio de cana-de-açúcar representou área total colhida de 8,3 milhões de hectares, o que torna o Brasil o maior produtor mundial da cultura, seguido por Índia e China (CONAB, 2021).

O aumento da demanda mundial por etanol, somado às grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis à cultura, tornam o Brasil muito competitivo no cenário sucroalcooleiro mundial (CONAB, 2021). No âmbito nacional, a agroindústria sucroalcooleira opera numa conjuntura positiva e sustentável, principalmente ao reduzir os efeitos indesejáveis da utilização dos combustíveis fósseis, cujo carbono lançado na atmosfera é causa importante do aquecimento global (CONAB, 2021).

Diante da importância da cultura no Brasil e no mundo, o desenvolvimento de protocolos bem estabelecidos para produção de mudas de alta qualidade é determinante para o crescimento do setor. A cana-de-açúcar é propagada vegetativamente por meio da brotação das gemas do colmo, o que traz uma série de dificuldades para a implantação da cultura no campo (CRUZ *et al.*, 2015).

A cultura de tecidos é uma ferramenta importante para alavancar a qualidade e escalonar a produção vegetal. Ela é definida como um conjunto de técnicas para a manipulação de tecidos vegetais, realizadas em condições de alto controle asséptico, nutricional, hormonal, de luminosidade (intensidade e fotoperíodo) e temperatura. Dentre as técnicas de cultura de tecidos encontram-se a multiplicação *in vitro*, a qual possibilita a clonagem comercial de cana-de-açúcar em larga escala por meio de biofábrica (CRUZ *et al.*, 2015).

A técnica apresenta vantagens como multiplicação rápida e uniforme de plantas selecionadas, produção de mudas livres de doenças (fungos, vírus e bactérias), programação e agendamento da produção durante todo o ano e independente a estação climática (CRUZ *et al.*, 2015). Contudo, a qualidade das mudas produzidas pela multiplicação *in vitro* pode influenciar na percentagem de sobrevivência, na velocidade de crescimento e na produção final. Além disso, por terem maior potencial de crescimento, as mudas exercem um melhor controle de plantas invasora, reduzindo os custos com tratamentos culturais (CRUZ *et al.*, 2015). A utilização de

mudas sadias de cana-de-açúcar pode aumentar a produtividade da cultura de 10 a 30% e a longevidade dos canaviais em 30% (LEE *et al.*, 2007). Sendo assim, a implantação de novas tecnologias que possibilitam a propagação de mudas mais vigorosas e sadias aumenta a produtividade e competitividade dos produtores.

Os riscos com relação a multiplicação *in vitro* para a produção de mudas estão relacionados a cultura de tecidos vegetais em geral, tais como possibilidade de contaminação, envelhecimento das plantas em frasco, variações fisiológicas encontradas devido ao uso constante de reguladores, variação somaclonal gerando variabilidade fenotípica nas plantas propagadas (LEE *et al.*, 2007). A contaminação pode ser mitigada com um bom controle, profissionais experientes e protocolos bem estabelecidos para a cultura/variedade, possibilitando a produção em massa de plantas com qualidade. Entretanto, o tempo de cultivo *in vitro* pode estar correlacionado com variações somaclonais/fenotípicas, principalmente devido a utilização de reguladores de crescimento na etapa de multiplicação e enraizamento *in vitro* (BURNER ; GRISHAM 1995).

A variação somaclonal é definida como a variação originada em cultura de células e tecidos de natureza genética, citogenética, epigenética ou molecular (LARKIN ; SCOWCROFT, 1981). Atualmente o termo variação somaclonal é universalmente usado para todas as formas de variantes provenientes de cultura de tecidos, a qual deve ser herdável através de um ciclo sexual. Porém nem sempre é possível demonstrar a sua herdabilidade devido a dificuldades de reprodução sexual em algumas culturas. Essas dificuldades incluem a ausência de produção de sementes, ciclos longos e poliploidia (BAIRU *et al.*, 2011). Segundo Silvarolla (1992), fatores como tempo de cultura, número de subcultivos, concentração de fitorreguladores, tipo de explante, genótipo, composição do meio de cultura, nível de ploidia e mosaicismo são considerados agentes capazes de induzir variabilidade *in vitro*.

O estresse *in vitro* pode ser ocasionado pelo descontrole do ciclo celular, onde reguladores de crescimento aceleram o ciclo e isto pode comprometer a integridade do material genético propagado (SANTOS, 1994). As consequências desse estresse *in vitro* podem ser aberrações cromossômicas, mutações de ponto, ativação de elementos transponíveis, amplificação gênica, alterações no DNA das organelas, mudanças na quantidade de DNA total e no número de cópias do DNA repetitivo. As causas não genéticas podem ser de natureza fisiológica ou epigenética (PHILIPS *et al.*, 1990).

Em cana-de-açúcar os fenótipos mais comuns de variação somaclonal são nanismo, albinismo, calosidade nos internós e superbrotação das gemas laterais (HEINZ; MEE, 1971; DAMASCO *et al.*, 1996; BURNER; GRISHAM, 1995; IRVINE, 1984 e IRVINE *et al.* 1991).

Dutra *et al.* (2011) indicam que o tempo de cultivo para obtenção de 500 clones de cana-de-açúcar via multiplicação *in vitro* é de aproximadamente vinte semanas. O objetivo deste trabalho é otimizar o protocolo de multiplicação *in vitro* para a redução desse período. Com isso, espera-se aperfeiçoar a multiplicação *in vitro* de cana-de-açúcar, resultando na diminuição dos gastos com energia elétrica, água, tratos culturais e insumos laboratoriais, com aumento de qualidade das mudas propagadas e diminuição de tempo de cultura *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

Acredita-se que a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) tem sua origem nas regiões do Sudeste Asiático e Oceania e foi introduzida no Brasil no século XVI pelos portugueses durante o período colonial (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011; GONZAGA, 2012). A cana caracteriza-se pelo formato cilíndrico, ereto, fibroso e rico em açúcar, com colmos alongados, e no ápice, folhas grandes e finas. Esta planta tem a capacidade de se desenvolver em forma de touceira, sendo a parte aérea formada por colmos, folhas, inflorescências, e a subterrânea formada por raízes e rizoma (GONZAGA, 2012).

A cana-de-açúcar está entre as espécies de maior rendimento fotossintético da família Poaceae. Como possui metabolismo C4, a cultura apresenta elevada eficiência no resgate e utilização do gás carbônico atmosférico, além de alta adaptabilidade às condições de alta luminosidade e temperaturas elevadas (MARCATO *et al.*, 2018). Já com relação a produtividade no campo, o processo produtivo canavieiro visa três objetivos básicos: alta produção de colmos por unidade de área; alta concentração de açúcar nos colmos industrializáveis; e longevidade do canavial. Diversos fatores influenciam a qualidade dos colmos, tais como: variedade da cultura; idade fisiológica, condições climáticas durante o desenvolvimento e maturação, propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, tipo de cultivo entre outros (GONZAGA, 2012).

O período de colheita da cana está relacionado com sua maturação. A maturação acontece geralmente nos meses frios e, portanto, a colheita é realizada no inverno. Entretanto, em países tropicais como o Brasil, o período de maturação é regulado pelo período de seca do ano ou, dependendo da região, pela descontinuidade da irrigação (SCHMIDT *et al.*, 2015). Uma vez plantada permanecerá produzindo durante quatro ou cinco anos consecutivos, quando,

então, a produtividade começa a diminuir, indicando que deve ser feita a reforma do canavial. Em termos de números de cortes e produtividade da cana, existem lavouras no Brasil com mais de dez cortes, apesar da recomendação ser para que a renovação ocorra após a colheita do quinto corte. Alguns estudos mostram que a produtividade do canavial cai de aproximadamente 115 t/ha nos dois primeiros cortes para menos de 55 t/ha ao se atingir o sexto (SCHIMDT *et al.*, 2015).

O plantio de cana-de-açúcar é um momento crucial para o estabelecimento, desenvolvimento e produtividade da cultura, pois as decisões tomadas neste momento irão durar todo o ciclo de cultivo. Assim, com o plantio adequado pode-se evitar pragas, plantas invasoras e proporcionar boas características de solo que levarão consequentemente à longevidade do canavial (SILVA, 2017).

Mundialmente a cultura contabiliza perdas de aproximadamente 20% ao ano, considerando somente o ataque de pragas. A cana pode ser atacada por mais de 80 espécies de insetos, como formigas, percevejos, besouros e cupins. Muitas dessas pragas são observadas nas lavouras apenas após terem causado danos (SCHIMDT *et al.*, 2015). Entre as pragas de maior importância econômica na cana-de-açúcar destacam-se a broca do colmo (*Diatraea* ssp.), cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata*), formiga-saúva (*Atta bisphaerica* e *Atta capiguara*), os cupins (*Heterotermes tenius*), os besouros (*Migdolus fryanus*) e o bicudo-da-cana-de-açúcar (*Sphenophorus levis*) (SCHIMDT *et al.*, 2015).

Além das pragas, esta cultura também é acometida por patógenos que se utilizam de colmos, folhas e outras estruturas como substrato para sua atividade e crescimento. Dentre as doenças causadas por fungos destacam-se a ferrugem (*Puccinia melanocephala*), carvão (*Ustilago scitaminea*) e a podridão causada por fusariose (*Fusarium moniliforme*). Dentre as bactérias patogênicas destacam-se a escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*), estria vermelha (*Acidovorax avenae*) e raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli*) (ROSSETTO; SANTIAGO, 2020).

Além dos fatores bióticos relatados, os estresses abióticos também possuem um importante impacto econômico na cultura, como temperaturas extremas, déficit hídrico, salinidade e deficiência nutricional (GILLIHAM; ABLE; ROY, 2017).

A ocorrência de geadas e temperaturas baixas podem causar danos irreversíveis e limitam práticas de manejo que possam diminuir as perdas de produtividade e qualidade (HARTER, 2021). Os principais danos causados pelo frio são diminuição da taxa fotossintética e do teor de clorofila (ZHANG *et al.*, 2015), podendo acarretar a destruição de cloroplastos, atividades enzimáticas reduzidas e impactos mecânicos que facilitam a proliferação de

microrganismos que degradam os açúcares nos tecidos (HARTER, 2021). Especificamente na cultura da cana-de-açúcar os fatores climáticos (secas, frio e geadas) também podem ocasionar o florescimento excessivo do canavial, gerando isoporização do colmo e doenças, levando a queda de produtividade (SCHMIDT *et al.*, 2015).

O déficit hídrico é responsável por ocasionar impactos fisiológicos de desidratação celular afetando diretamente o metabolismo das plantas (BARTELS; SUKAR, 2005). Como forma de diminuição do estresse, a cana-de-açúcar promove o fechamento de estômatos, enrolamento foliar, indução do crescimento radicular e inibição do crescimento do caule e folhas (INMAN-BAMBER; LAKSHMANAN; PARK, 2012).

Os programas de melhoramento genético estão cada vez mais aplicados para selecionarem genótipos mais tolerantes aos estresses bióticos e abióticos, a fim de diminuir as perdas de produtividade na cultura de cana-de-açúcar. Diversas pesquisas estão sendo realizadas para desenvolvimento de novos métodos de produção e tecnologias de cultivo, bem como desenvolvimento de novos híbridos via melhoramento genético. Além disso, a primeira cana geneticamente modificada regulamentada no mundo é brasileira. O produto foi desenvolvido pela empresa CTC em 2017 com o *trait* de resistência contra uma das principais pragas do setor: a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). As técnicas de engenharia genética estão fornecendo novos patamares com rendimentos aumentados, novas resistências a pragas e doenças, podendo resultar em menor aplicação de pesticidas e produtos químicos, melhorando ainda mais o desempenho da colheita (KAUP, 2015).

2.2 Formas de propagação

A cana-de-açúcar pode se reproduzir a partir de dois métodos: assexuada, por meio da propagação vegetativa, e sexuada, por meio da produção de sementes. A propagação vegetativa gera clones idênticos à planta mãe, além de permitir a multiplicação desse genótipo selecionado gerando mudas. Existem diversos métodos para produção de mudas que vão desde os mais clássicos que consistem na retirada de fragmentos do colmo contendo gemas e transplante para o solo, aos mais desenvolvidos como utilização de micropropagação, sempre buscando produção de mudas de qualidade, livres de patógenos e com alta homogeneidade (SILVA, 2017).

A reprodução sexuada se dá a partir da produção de sementes, em sua maioria híbridas, obtidas por cruzamento de espécies ou variedades, buscando o desenvolvimento de canas com características de interesse, tais como: alto teor de sacarose, resistência a doenças e pragas,

adaptação a determinado tipo de clima e solo, além de elevada produtividade. Como a planta apresenta elevada capacidade de propagação vegetativa, as variedades são multiplicadas e comercializadas com base na clonagem. A principal forma de propagação é através da brotação de gemas obtidas a partir de segmentos dos colmos. Este ainda é o método mais utilizado nos atuais plantios comerciais e pouco mudou desde o início do cultivo da cultura no Brasil (SCHMIDT *et al.*, 2015).

Mesmo com elevados esforços em pesquisa para aprimorar o plantio de cana-de-açúcar, ainda existem gargalos logísticos e de produção de mudas. A exemplo disso, para o plantio de 1 hectare são necessárias de 10 a 20 toneladas de toletes de cana, seções caulinares com gemas que gerarão novas mudas. Essa grande quantidade de propágulos contrasta bastante com a cultura de grãos, como soja e milho, em que para o plantio de 1 hectare são necessários apenas cerca de 60 quilos de sementes (SILVA, 2017). O plantio de cana-de-açúcar tem evoluído, mesmo assim, ainda utiliza menos tecnologia nas operações do manejo do plantio à colheita, se comparado ao cultivo de milho e soja. Essa baixa tecnificação se deve, pelo menos em parte, ao formato dos meios de propagação da cana, que exigem um maquinário maior e com menos rendimento de campo (MARCATO *et al.*, 2018).

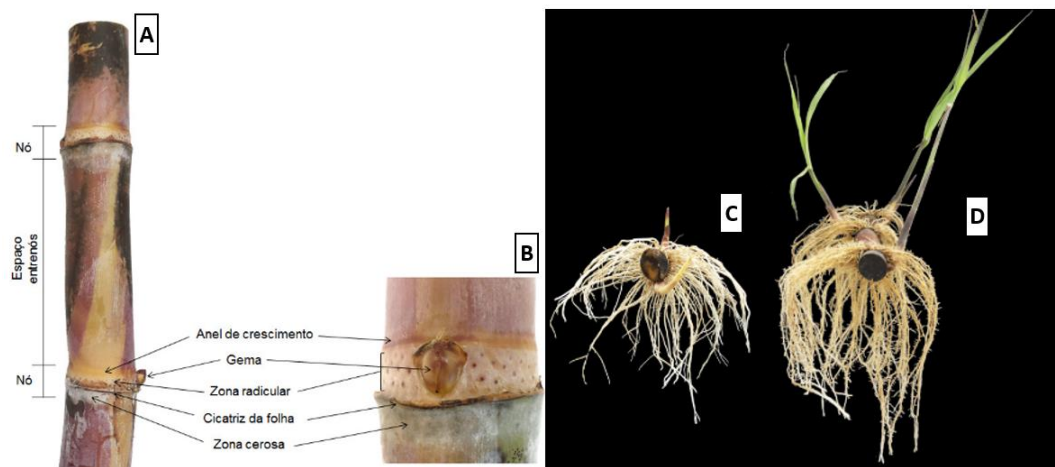
O uso de novas tecnologias para o plantio de cana-de-açúcar torna-se importante para aumentar a produtividade por meio da formação de canavial homogêneo e livre de doenças. O desenvolvimento de novas técnicas, como a multiplicação *in vitro*, visa melhorar o sistema clássico de propagação desta importante cultura, proporcionando melhores rendimentos e sustentabilidade ao setor canavieiro (SILVA, 2017).

2.3 Sistema convencional de produção de mudas

Tradicionalmente, a multiplicação dos canaviais ocorre a partir da propagação vegetativa, que é feita utilizando gemas laterais presentes no colmo (FIGURA 1). Os colmos são depositados no sulco de plantio de forma manual ou mecânica, usando fragmentos de colmos com 3 a 5 gemas com tamanhos de 30 a 50 cm. Elas devem estar livres de patógenos, ter alta capacidade de brotação e ser de uma variedade produtiva. O plantio envolve quatro etapas principais: em locais distintos das áreas de plantio é feita a coleta dos colmos, transporte, seccionamento (picagem) e sua distribuição nos sulcos. Por último, são realizadas a adubação e a cobertura das mudas (OLIVEIRA, 2019).

A brotação de toletes (FIGURA 1) ocorre em temperaturas de solo entre 27°C e 33°C. As temperaturas que prejudicam a emergência e a brotação da cana-de-açúcar são as inferiores a 20°C e superiores a 35°C. A brotação das mudas ocorre de 20 a 30 dias após plantio, sendo influenciada por fatores como profundidade de plantio, temperatura, posição da gema ao longo do colmo e umidade no solo. Durante esse período a planta se desenvolve utilizando as reservas de energia (açúcares) e nutrientes existentes no colmo (OLIVEIRA, 2019).

Figura 1 – Porção de cana-de-açúcar - (A) Tolete; (B) Nó do tolete de cana-de-açúcar e suas partes; (C) Desenvolvimento das raízes de fixação a partir das pontuações radiculares; (D) Desenvolvimento de brotos a partir de gemas.



Fonte: Thomas, 2015

Os perfilhos primários são colmos advindos de gemas subterrâneas dos rizomas. A partir deles surgem os secundários e, assim, sucessivamente. O perfilhamento é responsável por formar as touceiras, estrutura importante na produtividade da cana-de-açúcar. Os nós se formam nos colmos, seguidos da elongação dos espaços entrenós. Posteriormente, se originaram as folhas. No desenvolvimento da parte aérea acontece alongamento celular com aumento de massa seca da parte aérea e raiz da planta. Cerca de 60% do sistema radicular da cana-de-açúcar se localiza na camada mais superficial do solo, nos 20 a 30 cm de profundidade. Outras raízes podem chegar a ter 85% na profundidade abaixo de 50 cm do solo, podendo variar de acordo com as variedades (OLIVEIRA, 2019). A interação entre os fatores fotoperíodo, umidade, temperatura do ar, radiação solar e fertilidade do solo podem manter, aumentar ou prevenir a transformação do ápice da cana-de-açúcar de crescimento vegetativo para reprodutivo (ARALDI *et al.*, 2010). Essa transição para a formação de inflorescência é indesejável para fins produtivos, pois diminui o teor de açúcar do colmo.

Um outro sistema de produção de mudas utilizado atualmente no Brasil é a Muda Pré-Brotada (MPB). Este método visa produzir mudas de alta qualidade com bom vigor, sistema radicular e sanidade. Desde que todas as etapas de produção do MPB sejam bem realizadas é possível atingir essa qualidade de forma simples e com ótimos resultados em plantios posteriores. Esse sistema se baseia na utilização de toletes com uma gema, que são plantados em substrato para que ocorra brotação e crescimento das mudas (OLIVEIRA, 2019). As MPBs permanecem 45 dias em ambiente protegido e, em seguida, passam por duas fases de aclimação: a primeira em tela de sombreamento (sombrite) e a segunda a céu aberto, podendo então serem levadas para o campo. Essas gemas são cuidadosamente escolhidas, as danificadas e com presença de patógenos são eliminadas, garantindo a redução do volume de colmos e o melhor controle na qualidade de vigor, resultando em canaviais de excelente padrão clonal e, portanto, com maior homogeneidade (OLIVEIRA, 2019).

Esse sistema de produção de mudas começou a ser desenvolvido primeiramente no Brasil pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Algumas décadas depois o sistema foi adotado também na Índia, objetivando principalmente o aumento da qualidade das mudas produzidas e o controle de patógenos que atacam a cana na fase de germinação no campo, como o raquitismo das soqueiras. Enquanto nos métodos convencionais utiliza-se 10 a 20 toneladas de toletes para o plantio de um hectare, no plantio com MPB o uso de mudas cai para 2 toneladas por hectare (MARCATO *et al.*, 2018).

A técnica de MPB mostra-se usual no replantio de áreas comerciais, proporciona uniformidade na produção do canavial e redução do volume utilizada para o plantio. Durante os 60 dias iniciais da brotação, os níveis de reserva contido no minirrebolo são essenciais para o desenvolvimento da muda. Nesse período, por causa da quebra do domínio apical, inicia-se o crescimento e desenvolvimento dos primórdios de raízes presentes no anel de enraizamento e da parte aérea (SILVA, 2017).

Com relação aos obstáculos enfrentados na produção de mudas no sistema MPB, destacam-se:

- A necessidade de irrigação é um dos principais obstáculos desse sistema, principalmente nas fases iniciais, após o transplante, quando a planta necessita de água para o pegamento e desenvolvimento inicial. Porém, este fato pode ser minimizado quando a área for plantada no período das chuvas e estas forem bem distribuídas (MARCATO *et al.*, 2018);

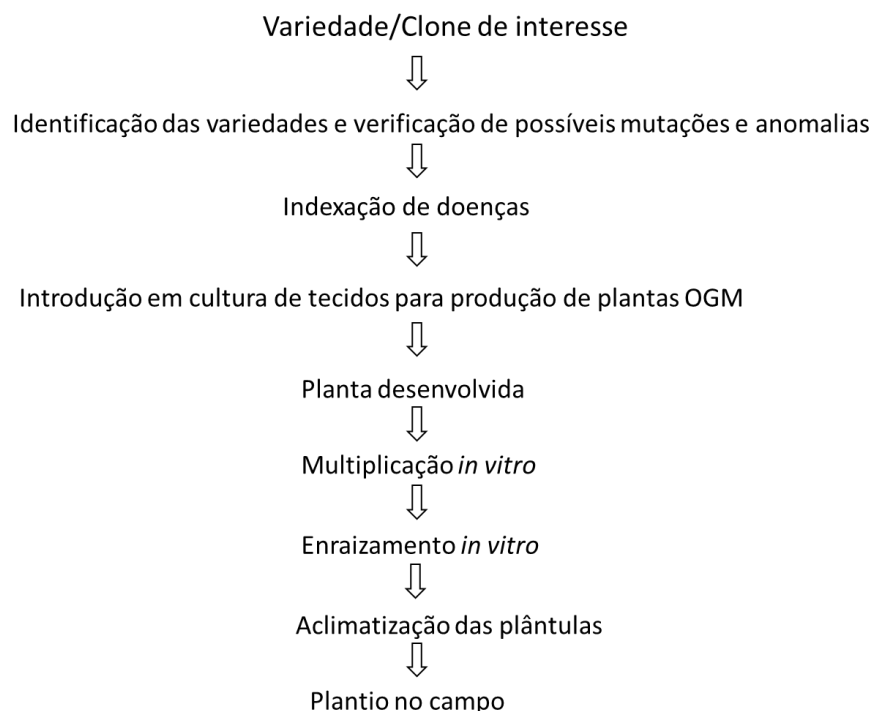
- Por ser uma técnica de plantio recém-criada, poucos estudos foram desenvolvidos para aprimorar o sistema de MPB. Assim, pesquisas para reduzir o tempo de viveiro e aumentar a sobrevivência em campo são importantes para o sucesso deste cultivo;

- As perdas de produção podem ser elevadas se o setor não tiver um eficiente manejo varietal e cuidados adequados em relação à sanidade das mudas utilizadas para a multiplicação de viveiros.

2.4 Multiplicação *in vitro*

A multiplicação *in vitro* de plantas está cada vez mais importante no Brasil em termos científicos, tecnológicos, de infraestrutura, de ensino e de aperfeiçoamento humano. No dia 27 de agosto de 2012 foi publicado no diário oficial da União a Instrução Normativa nº 22 (DOU de 28/08/2012, nº 167, Seção 1, pág. 2), que tem por objetivo estabelecer as “Normas para a Produção e a Comercialização de Mudanças e de Outras Estruturas de Propagação Obtidas por Meio de Cultura de Tecidos de Plantas”. Isto se deve a necessidade de se organizar uma cadeia produtiva crescente (MARTINS ; CARVALHO, 2012).

O conceito de biofábrica de cana-de-açúcar começou a ser definido em 1983 pela equipe de Lee, no laboratório de Fisiologia do antigo Planalsucar (IAA/PLANALSUCAR,1983). Segundo Lee *et al.* (2007), biofábrica pode ser definida como uma fábrica que utiliza métodos biotecnológicos para a produção de plantas em larga escala com processos bem definidos. A sua implementação deve ter etapas bem estabelecidas, conforme o fluxograma adaptado extraído do trabalho de Lee *et al.* (2007) abaixo:



Diferentes protocolos de micropropagação de cana-de-açúcar mostram a viabilidade desta técnica em meio semissólido, líquido estacionário e por imersão temporária (FERREIRA *et al.*, 2016). Os protocolos descritos para a regeneração *in vitro* têm como base processos de organogênese e embriogênese somática. Entretanto, como a resposta morfogênica é fortemente influenciada pelo genótipo, é ideal que seja realizada ajustes de protocolo em cada cultivar a ser utilizada (DE PAULA CIDADE *et al.*, 2006)..

Os recursos humanos empregados no processo convencional de micropropagação são responsáveis por 60% a 70% do custo final da muda. Portanto, qualquer medida que tenha como objetivo reduzir o envolvimento de mão de obra durante as etapas da micropropagação poderá contribuir significativamente para a redução do custo final da muda, tornando o processo mais econômico e eficiente. O biorreator de imersão temporária (BIT) foi desenvolvido com o objetivo de reduzir o número de frascos utilizados no processo, diminuindo a necessidade de sucessivas manipulações das culturas em capela de fluxo laminar e de subcultivos em frascos de alongamento (AMBROSANO, 2006). Há diversas vantagens em sua utilização comparada a técnica tradicional:

- a) aceleração do processo de multiplicação;
- b) redução significativa dos custos com mão de obra;
- c) adaptável a diversas espécies vegetais;
- d) uniformização da produção;
- e) simplicidade de montagem do sistema;
- f) eliminação do estresse gasoso e mecânico;
- g) redução do custo total por unidade produzida;
- h) utilização de computadores como sistema de controle e automação do processo.

3 OBJETIVO

Diminuir o tempo dos processos envolvidos na multiplicação *in vitro* de cana-de-açúcar, em biofábrica, seguindo as seguintes premissas:

- Assegurar a produção de, no mínimo, 500 clones por planta matriz;

- Obtenção das mudas com o mesmo padrão de qualidade do protocolo convencional, ou seja, raízes com mais de 3 cm de comprimento, área foliar acima de 8 cm² e haste caulinar maior que 5 cm;
- Porcentagem de contaminação *in vitro* ≤10%, considerando todas as etapas do processo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Fonte de material vegetal

O explante fornecido de cana-de-açúcar foi proveniente de plântulas estabelecidas do processo de transformação genética, com comprimento aproximado de 10 centímetros (FIGURA 2). Para não ocorrer interferência no material genético, foram utilizadas plantas controle (não geneticamente modificada (OGM)) provenientes de cultura de tecidos que passaram por todas as etapas de transformação genética.

Figura 2 - Plantas controle (não-OGM) para iniciarem a etapa da multiplicação *in vitro*.



Fonte: Autor (2023)

Neste trabalho foram conduzidos alguns testes para redução do prazo de multiplicação *in vitro* de plântulas de cana-de-açúcar. Ao todo foram realizados 4 experimentos diferentes, todos com delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial. No experimento 1 o objetivo foi analisar o melhor tipo de container para testar duas questões principais: área de desenvolvimento da plântula e volume de meio de cultura (disposição de nutrientes). Além disso, também foi testada a agitação em *shaker* para saber se essa auxilia na taxa de multiplicação, uma vez que proporciona melhor aeração do material. No experimento 2 foi testado o manejo no biorreator de imersão temporária. Esse manejo se trata da separação das plântulas que tendem a envelhar no biorreator, bem como a limpeza de perfilhos mortos. O

experimento 3 teve por objetivo testar os melhores parâmetros de tempo e periodicidade de imersão do meio líquido no biorreator. Por fim, no experimento 4 foi avaliado a concentração adequada de sacarose e diferentes tipos de reguladores de crescimento na fase de enraizamento, assim como o manejo das plântulas. O meio de cultura de multiplicação (Tabela 1) foi adaptado do trabalho de Franca (2016) e foi padrão para todas as etapas. O meio de enraizamento tem a mesma base, porém com modificações na concentração de sacarose e troca do regulador citocinina por auxina. Também foi analisado em todas as etapas a taxa de contaminação (perda de material por fungo e bactéria).

Tabela 1 - Meio de cultura de multiplicação *in vitro* de explantes de cana-de-açúcar.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Sacarose	20 g/L
SAL MS	4,3 g/L
Kinetina	1 mg/L
BAP	0,2 mg/L

Fonte: Adaptado de Franca, 2016

4.1 Experimento 1

O objetivo deste experimento foi analisar o uso de diferentes containers para verificar se a quantidade de meio de cultura disponível para as plântulas auxilia na taxa de multiplicação (Falcon 5 mL e frasco *Schott* 30 mL), além de testar volumes diferentes de espaço de desenvolvimento do material (Falcon 50 mL e frasco *Schott* 300 mL). Somado a isso, também foi testada a ausência ou presença de agitação para analisar se a aeração no meio de cultura potencializa a formação de perfilhos. Os protocolos foram adaptados dos trabalhos de Dantu *et al.* (1992) e Pereira e Fortes (2003), respectivamente.

Como primeira ação no recebimento das plântulas provenientes do processo de transformação genética, realizou-se a poda das folhas aéreas e a limpeza da base do explante, eliminando resquícios de folhas necrosadas. Além disso, foi realizada a remoção total das raízes, garantindo apenas uma planta matriz para o processo de multiplicação. Cada plântula foi transferida para um dos containers a serem testados (definido pela Tabela 2) contendo o meio de cultura de multiplicação (Tabela 1). As plântulas foram acondicionadas em uma sala de crescimento sob temperatura de 26°C (\pm 2°C), lâmpadas fluorescentes (aproximadamente

3500 luxes de intensidade luminosa), fotoperíodo de 16 horas, podendo ou não estar sob agitação de *shaker* em 50 RPM (Tabela 2) (adaptação FERREIRA *et al.* (2016)). As trocas de meio de cultura foram feitas em intervalos semanais. Esse experimento contou com vinte réplicas dos quatro tratamentos dados pela combinação dos dois fatores da Tabela 2, totalizando oitenta unidades experimentais.

Tabela 2 - Tratamentos avaliados na primeira fase de multiplicação.

Container	Agitação <i>Shaker</i>
Tubo Falcon 50 mL	Presente
	Ausente
Frasco <i>Schott</i> de 300 mL	Presente
	Ausente

Fonte: Adaptado de Dantu *et al.* (1992) e Pereira e Fortes (2003)

Após quatro semanas foram contados os perfilhos de cada unidade experimental. Uma ANOVA foi aplicada aos dados para avaliar se houve diferenças entre os tratamentos. Ademais, a perda de unidades experimentais por contaminação foi contabilizada. Importante salientar que esses explantes foram destinados para a segunda fase de experimentação: multiplicação via Biorreator de Imersão Temporária (BIT).

Multiplicação das plantas em Biorreator de Imersão Temporária (BIT)

O material vegetal introduzido no biorreator foi selecionado de modo a estar livre de contaminação, sem presença de necrose e oxidação. Com o auxílio de uma pinça estéril e cabine de fluxo laminar, cinco plantas provenientes da fase anterior (experimento 1) foram introduzidas em cada container. Acondicionaram-se as plântulas em uma sala de crescimento sob temperatura de 26°C (\pm 2°C), lâmpadas fluorescentes (aproximadamente 3500 luxes de intensidade luminosa) e fotoperíodo de 16 horas luz. O subcultivo de meio de cultura foi feito em intervalos a cada duas semanas.

4.2 Experimentos 2 e 3

Os objetivos dos experimentos 2 e 3 foram determinar a metodologia de manejo das plântulas que foram cultivadas no biorreator, assim como os parâmetros de funcionamento do equipamento. Nas Tabelas 3 e 4 estão designados os tratamentos desses experimentos:

Tabela 3 - Tratamentos avaliados no experimento 2.

MANEJO	OPERAÇÃO
Poda aérea	Presente
	Ausente
Limpeza de perfilho	Presente
	Ausente

Fonte: Adaptado de Barros, *et al.*, 2009

Tabela 4 - Tratamentos com diferentes tempos nos parâmetros testados no biorreator do experimento 3.

PARÂMETRO	TEMPO
Imersão	2 minutos
	3 minutos
Permanência de meio de cultura	8 segundos
	30 minutos
Intervalo de troca	6 horas
	12 horas

Fonte: Adaptado de Franca, 2016

Referente ao experimento 2, o protocolo foi adaptado do trabalho de Barros, *et al.* (2009) e foi aplicado dez réplicas em cada um dos quatro tratamentos dados pela combinação dos fatores de manejo do explante e operação do biorreator, totalizando quarenta unidades experimentais. Foi determinado o teste de poda das folhas aéreas para analisar quebra de dominância apical para estabelecimento de maior taxa de perfilhamento. A limpeza dos perfilho (remoção de folhas necrosadas e oxidadas) foi realizada para verificar se a renovação foliar auxilia na multiplicação, além de diminuir compostos fenólicos no meio de cultura. Ambos os manejos foram realizados sempre que ocorreram as trocas de meio de cultura, ou seja, a cada duas semanas.

Quanto ao experimento 3 foi adaptado pelo protocolo estabelecido no trabalho de Franca (2016) e testado oito tratamentos dados pelo tempo de imersão, tempo de permanência do meio de cultura e intervalo de troca. O tempo de imersão é o período que os explantes ficam em contato com o meio de cultura em borbulhamento pelo próprio sistema, ou seja, foi analisado se o período de aeração em biorreator tem impacto na taxa de perfilhamento do material. Já o tempo de permanência é o período em que o meio de cultura fica em total contato com a planta, onde ocorre absorção de nutrientes. Por fim, o intervalo de troca é a periodicidade com que o ciclo recomeça, uma vez que as plântulas não ficam em contato direto com o meio de cultura.

Esses oito tratamentos foram avaliados em cinco réplicas, portanto quarenta unidades experimentais. Esses fatores foram analisados para determinação dos melhores parâmetros na fase de biorreator.

Após oito semanas da inoculação dos explantes em biorreator, contabilizou-se o número de perfilho com mais de 5 cm de comprimento de cada unidade experimental dos ensaios 2 e 3. Uma ANOVA foi aplicado aos dados para avaliar se há diferença entre os tratamentos e avaliou a perda de unidade experimental por contaminação. Então, foi endereçado os explantes para a terceira fase de experimentação: enraizamento via Biorreator de Imersão Temporária.

Fase de Enraizamento

A última etapa da multiplicação *in vitro* é o enraizamento, fase essencial para ocorrer a transferência das plantas para a casa de vegetação. Neste ciclo foi trocado o regulador de crescimento do meio cultura de citocinina (BAP e Kinetina) para uma fonte de auxina (IBA ou ANA), acondicionando as plântulas em uma sala de crescimento sob temperatura de 26°C (\pm 2°C), lâmpadas fluorescentes (aproximadamente 3500 luxes de intensidade luminosa) e fotoperíodo de 16 horas luz. As trocas de meio de cultura foram feitas em intervalos a cada duas semanas.

4.3 Experimento 4

O objetivo do experimento 4 foi analisar a necessidade de manejo na etapa de enraizamento, concentração de fonte de carbono (sacarose) e diferentes reguladores de crescimento. O protocolo foi adaptado dos trabalhos de Calamar ; De Klerk (2002), Custódio *et al.* (2004) e Franca (2016). O manejo pode ser importante para o correto enraizamento do

perfilho individualmente, uma vez que a cana-de-açúcar ao se multiplicar forma touceiras, assim muitas plântulas internas da touceira ficam sem enraizar por não conseguir contato com o meio de cultura. Quanto aos diferentes níveis de concentração de sacarose, o objetivo é avaliar se as partes aérea e radicular têm o seu desenvolvimento estimulado pela fonte de carbono. Por fim, o experimento com dois diferentes reguladores de crescimento (ácido indol-butírico (IBA em inglês) e ácido naftalenoacético (ANA)) foi importante para testar o maior estimulante de formação de raízes em biorreator. Na Tabela 5 estão registrados os tratamentos que foram avaliados nesse experimento.

Tabela 5 - Tratamentos avaliados na etapa de enraizamento.

ENRAIZAMENTO	AÇÃO
Manejo	Presente
	Ausente
Sacarose	20 g/L
	30 g/L
Regulador de crescimento	IBA (1 mg/L)
	ANA (1 mg/L)

Fonte: Adaptado de Franca, 2016

Foram realizadas três réplicas dos oito tratamentos dados pela combinação dos três fatores da Tabela 5, portanto vinte e quatro unidades experimentais.

O manejo foi realizado no momento da troca de meio de cultura, ou seja, a cada duas semanas. Este consiste na limpeza (remoção de folhas necrosadas e oxidadas) e desmembramento das plantas (quebra de touceira) que estão sendo multiplicados no biorreator.

Após três semanas de enraizamento se avaliaram as unidades experimentais e foram qualificadas conforme a Tabela 6. Só foi considerado um perfilho enraizado quando a raiz atingir no mínimo três centímetros de comprimento. A análise estatística para verificar se houve diferença nos tratamentos foi a ANOVA.

Tabela 6 - Parâmetros qualitativos para avaliação das raízes no final da fase de enraizamento.

Nota	Descrição
0	Plantas contaminadas e/ou menos 500 clones e/ou ausência de raiz
1	Raiz presente em $\leq 30\%$ das plantas (≤ 150)
2	Raiz presente em $\leq 50\%$ das plantas (≤ 250)
3	Raiz presente em $\leq 70\%$ das plantas (≤ 350)
4	Raiz presente em $\leq 80\%$ das plantas (≤ 400)
5	Raiz presente em $\geq 80\%$ das plantas (≥ 400)

Fonte: Autor (2023)

Análise estatística

Todas as análises foram feitas no programa *Minitab Statistical Software*[®] versão 20.4. As combinações dos fatores com os seus respectivos níveis foram compostas através da ferramenta DOE (*Design of Experiments*). Para a realização da ANOVA previamente foram verificados teste de normalidade e igualdade de variância. Para avaliar os tratamentos que tiveram significância estatística ($\alpha \leq 0,05$) foi utilizado gráfico Boxplot.

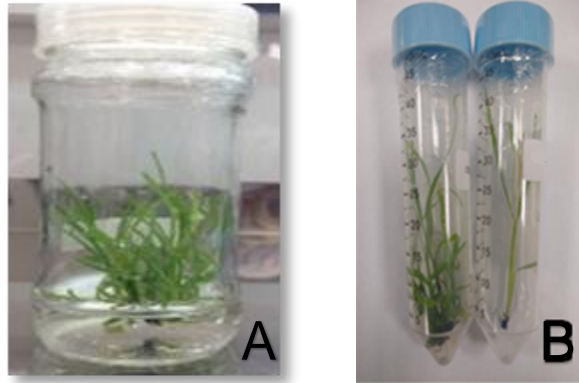
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de realizar um protocolo otimizado de multiplicação *in vitro* de cana-de-açúcar com plantas provenientes do processo de transformação genética, foram realizados quatro diferentes tipos de experimentos para investigar as três principais etapas de multiplicação *in vitro*: 1) estabelecimento do explante e início da propagação vegetativa; 2) fase de biorreator de imersão temporária; e 3) enraizamento.

5.1 Estabelecimento do explante e início da propagação vegetativa

A primeira investigação teve como foco a avaliação de dois tipos de containers, Falcon e frasco *Schott* (FIGURA 3), combinados com a agitação ou não do meio de cultura (*shaker*). O experimento fatorial contou com quatro tratamentos (dois fatores com dois níveis cada) e vinte réplicas em delineamento inteiramente casualizado, resultando em 80 unidades experimentais. A quantidade de réplicas, além de proporcionar robustez estatística, foi essencial para obter-se explantes suficientes para realizar os três experimentos seguintes, uma vez que cada experimento subsequente depende das plantas provenientes do teste anterior.

Figura 3 – Diferentes tipos de containers utilizados no experimento 1 para verificar seus efeitos no início do processo de multiplicação *in vitro*. (A) Frasco *Schott* de 300 mL; (B) Tubo Falcon de 50 mL.



Fonte: Autor (2023)

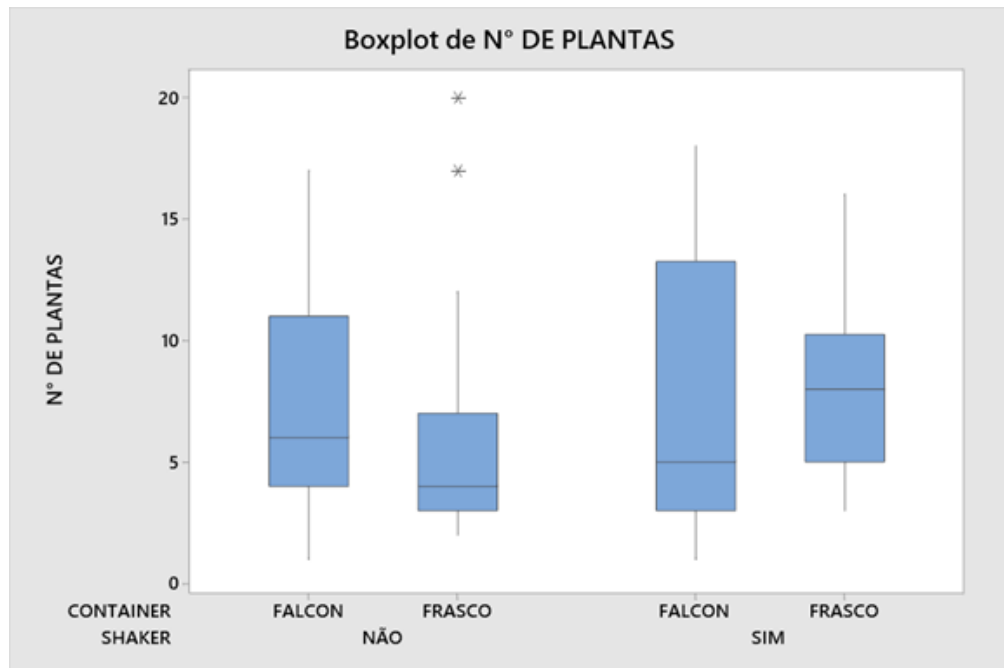
Após quatro semanas do início da multiplicação *in vitro* foi realizado a contagem do número de perfilhos gerados a partir de uma única planta matriz e avaliada a perda por contaminação devido a manipulação do material. Com os resultados do número de plantas de cada unidade experimental, aplicou-se uma análise de variância (ANOVA) para verificar se o tipo de container e a presença/ausência de aeração do meio de cultura afetam a taxa de perfilhamento. Os resultados das análises constam na Tabela 7 e FIGURA 4.

Tabela 7 – Resultado da ANOVA avaliando se o container e a aeração do meio de cultura afetam o número de plantas provenientes do experimento 1.

Fonte de var.	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
SHAKER	1	13.87	13.8677	0.61	0.437
CONTAINER	1	0.38	0.3768	0.02	0.898
SHAKER*CONTAINER	1	8.04	8.0391	0.35	0.554
Erro	75	1704.39	22.7252		

Fonte: Autor (2023)

Figura 4 – Boxplots com a distribuição do número de plantas obtido em cada tratamento do experimento 1. Os dados foram coletados após quatro semanas do início de multiplicação *in vitro*.



Fonte: Autor (2023)

Através do valor de p verifica-se que nenhum dos fatores foi significativo ($\alpha \leq 0,05$), ou seja, estatisticamente o número de plantas não diferem tanto com relação ao tipo de containers como com a utilização de *shaker* para aeração do meio de cultura. Além disso, também é verificado que a interação entre os fatores (container x *shaker*) não teve impacto significativo na formação de perfilhos a partir da planta matriz.

A investigação de diferentes containers para otimizar a taxa de multiplicação das plantas também foi realizada em um trabalho com *Gladiolus* (DANTU ; BHOJWAN, 1992), que constatou que uma maior aeração aumenta a taxa de multiplicação do material. Entretanto, para os explantes testados neste trabalho não houve essa mesma conclusão, pois o frasco com maior volume (frasco *Schott* - 300 mL) não aumentou a taxa de multiplicação comparado ao de menor volume (Falcon - 50 mL).

Segundo Alvard *et al.* (1993) e Grattapaglia ; Machado (1998), comumente os cultivos *in vitro* requerem agitação/aeração para fornecer oxigênio necessário para respiração dos explantes. Porém, não só como demonstrado neste experimento com cana-de-açúcar, mas também em outras culturas como a da batata (*Solanum tuberosum L.*), nem sempre há diferença na taxa de multiplicação quando ocorre a agitação do meio de cultura (PEREIRA; FORTES, 2003).

Quanto a contaminação do material, houve perda de apenas uma unidade experimental (frasco sem agitação), ou seja, uma taxa de 1,25%. Portanto, nenhum dos tratamentos aplicados trouxe risco para o processo.

Diante dos resultados obtidos para a primeira fase do protocolo de multiplicação *in vitro* das plântulas, recomenda-se o uso do tubo Falcon sem agitação do meio de cultura, uma vez que neste container o volume de meio de cultura é menor (5 ml por unidade, frente aos 30 mL do frasco *Schott*) e não é necessário o gasto com aquisição de equipamento (*shaker*) e de energia elétrica, reduzindo o custo para a produção das mudas.

5.2 Fase de Biorreator de Imersão Temporária (BIT)

Os experimentos realizados na fase de multiplicação de plantas em Biorreator de Imersão Temporária têm por objetivo determinar os melhores parâmetros de funcionamento, bem como otimizar o manejo das plantas. No experimento 2 testou-se a presença/ausência de poda das plântulas e a remoção ou não de folhas necrosadas e oxidadas. Os resultados estão dispostos na Tabela 8 e FIGURA 5.

Tabela 8 – Resultado da ANOVA do experimento 2, avaliando os efeitos da poda e limpeza do material no número de plantas multiplicadas.

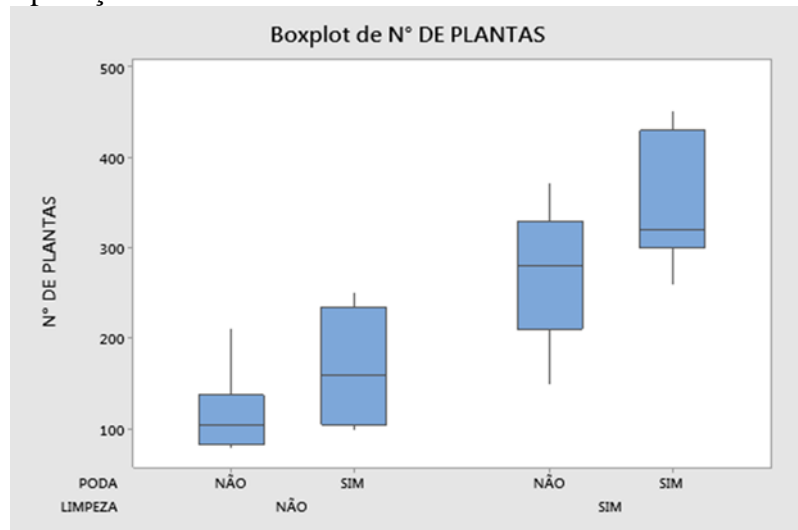
Fonte de var.	GL	QM		Valor F	Valor-P
		SQ (Aj.)	(Aj.)		
PODA	1	40425	40425	9,72	0,004
LIMPEZA	1	233847	233847	56,24	0
PODA*LIMPEZA	1	2294	2294	0,55	0,464
Erro	75	120582	4158		
Total	32	379618			

Fonte: Autor (2023)

A utilização da poda das folhas superiores das plantas de cana-de-açúcar foi aplicada para aumentar a taxa de perfilhamento por meio da perda de dominância apical do material. A auxina é produzida no ápice meristemático de órgãos aéreos, assim como gemas em brotamento, folhas jovens e, em menor proporção, nas extremidades das raízes e flores. Sob alta relação auxina/citocinina, a formação das raízes é estimulada enquanto a brotação lateral (perfilhamento) é reprimida. Assim, com a realização da poda elimina-se a maior fonte de auxina, diminuindo a relação auxina/citocinina e ocasionando a perda da dominância apical.

Com isso, há a ativação de gemas laterais e maior perfilhamento do material (BARROS *et al.*, 2009). Pelos dados da Tabela 8 verifica-se que a realização da poda aumentou significativamente ($\alpha \leq 0,05$) o número de plantas, condizendo com a literatura científica.

Figura 5 – *Boxplots* com a distribuição do número de plantas obtido nos diferentes tratamentos do experimento 2. Os dados foram coletados após 8 semanas do início de multiplicação *in vitro*.

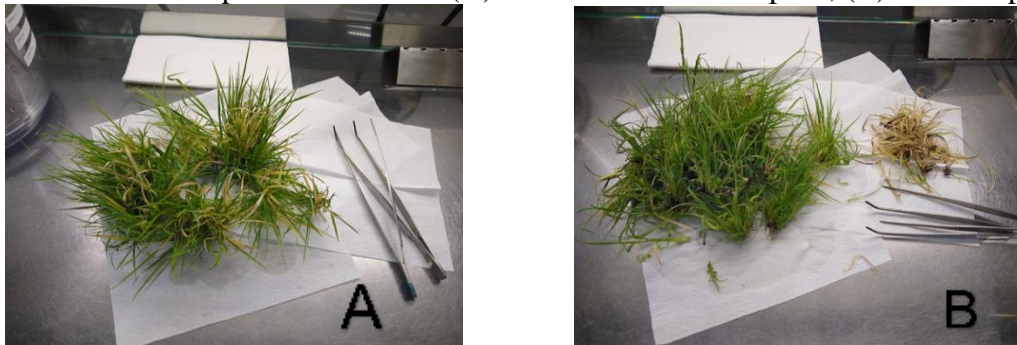


Fonte: Autor (2023)

A limpeza dos explantes (FIGURA 6) foi realizada por meio da remoção de folhas oxidadas e necrosadas, com o intuito de diminuir a oxidação fenólica no ambiente de propagação do material. A oxidação fenólica constitui um dos mais sérios problemas no estabelecimento e propagação vegetativa, podendo ocasionar a morte do material vegetal e a abscisão foliar precoce. Isso porque esses compostos fenólicos acarretam o acúmulo de etileno nos tecidos cultivados *in vitro*, tornando o explante mais frágil e reduzindo o seu desenvolvimento (KEARBAUY, 2008). Os resultados da ANOVA indicam que a limpeza do material também aumentou o número de plântulas multiplicadas ($\alpha \leq 0,05$).

A ANOVA indicou que a interação entre os dois fatores (poda e limpeza) não foi significativa ($\alpha \leq 0,05$). Ou seja, os efeitos da poda e limpeza se combinam de forma aditiva.

Figura 6 – Plântulas de cana-de-açúcar retiradas com seis semanas após o início da fase de multiplicação *in vitro* via biorreator de imersão temporária para realização da poda e limpeza do material. (A) material antes da limpeza; (B) material pós limpeza.



Fonte: Autor (2023)

A taxa de contaminação do experimento 2 foi avaliada no final de oito semanas e foram perdidas sete unidades experimentais (17,5%). Essa maior taxa de contaminação está correlacionada com a maior manipulação do material vegetal (poda e limpeza), pois mesmo em ambiente estéril (fluxo laminar) o alto volume de plantas expostas acarreta maior risco de contaminação por bactérias e fungo. Entretanto, melhores técnicas de assepsia podem ser estudadas e aplicadas para evitar esse risco para o processo.

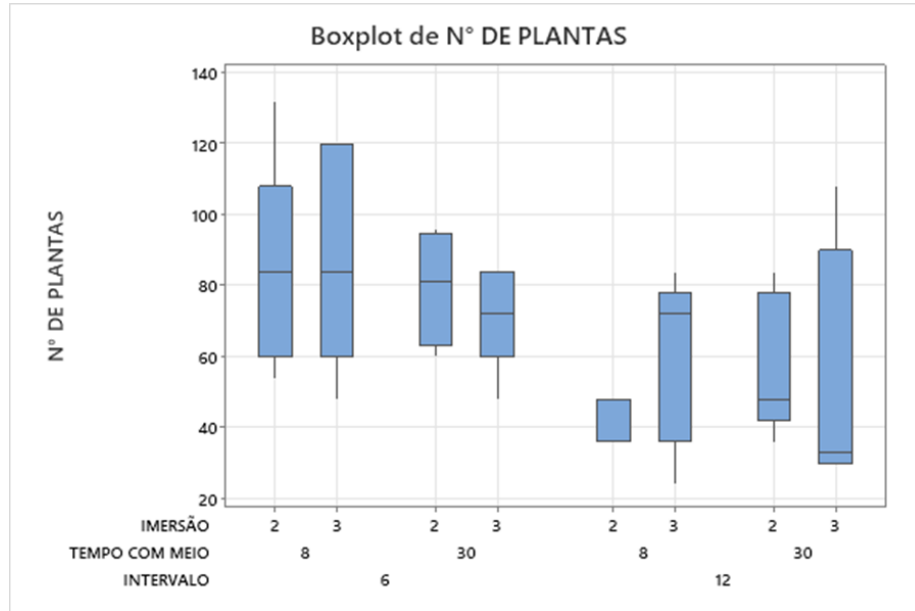
Referente ao experimento 3, este foi realizado para determinar os melhores parâmetros de funcionamento do biorreator. Nele foram avaliados o tempo de imersão, tempo de permanência do meio de cultura e intervalo de troca. Foram realizadas cinco réplicas nos oito tratamentos, ou seja, quarenta unidades experimentais. Os resultados estão dispostos na Tabela 9 e FIGURA 7.

Tabela 9 – Resultado da ANOVA do número de plantas provenientes do experimento 3, avaliando os parâmetros do BIT.

Fonte de var.	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
IMERSÃO	1	57,7	57,65	0,1	0,756
TEMPO COM MEIO	1	107,2	107,21	0,18	0,671
INTERVALO	1	7765,9	7765,89	13,3	0,001
IMERSÃO*TEMPO COM MEIO	1	853,9	853,89	1,46	0,236
IMERSÃO*INTERVALO	1	137,7	137,7	0,24	0,631
TEMPO COM MEIO*INTERVALO	1	498,1	498,12	0,85	0,363
IMERSÃO*TEMPO COM MEIO*INTERVALO	1	107,2	107,21	0,18	0,671
Erro	30	17515,8	583,86		
Total	37	27228,3			

Fonte: Autor (2023)

Figura 7 – *Boxplots* com a distribuição do número de plantas obtido nos tratamentos do experimento 3. Os dados foram coletados após 8 semanas do início de multiplicação *in vitro*.



Fonte: Autor (2023)

Por meio da ANOVA foi constatado que o único tratamento com efeito significativo ($\alpha \leq 0,05$) na propagação das plantas foi o intervalo de troca, onde 6h apresentou uma maior taxa de multiplicação do que 12h. Uma preocupação seria que a maior frequência de imersão poderia acarretar hiperhidricidade das folhas e aumentar a taxa de oxidação, inibindo o crescimento das plantas podendo levar a morte pelos compostos fenólicos produzidos (SATO et al, 2001). Entretanto, o maior intervalo de troca disponibilizaria pouco nutriente e recursos para o material, acarretando um déficit nutricional e, portanto, menor taxa de multiplicação (OLIVEIRA et al., 2014). Em nenhum dos tratamentos foi constatado alta oxidação e hiperhidricidade no material, mesmo com frequência de nutrição maior (6h). Porém o intervalo de 12h obteve baixa taxa de propagação vegetativa devido a menor disponibilidade de recursos (água e nutrientes) para as plantas.

O tempo de imersão está relacionado com o borbulhamento do meio de cultura, ou seja, a aeração do material, pois o biorreator injeta ar filtrado para dentro do sistema. Para certas culturas *in vitro* a aeração pode ser determinante na respiração dos explantes e, portanto, na sua taxa de multiplicação (ALVARD et al.,1993; GRATTAPALIA; MACHADO, 1998). Porém, nesse estudo, os níveis analisados (2 e 3 minutos) não diferiram quanto à taxa de perfilhamento do material.

Por fim, o tempo de permanência é outro importante fator a ser avaliado. Este é o tempo em que os explantes ficam em contato com o meio de cultura quando o sistema é acionado. A hipótese gerada é que um maior tempo de contato com o meio de cultura aumentaria a absorção de nutrientes pelo material e levaria a uma maior taxa de multiplicação. Porém, não houve diferença nos tratamentos de 8 segundos e 30 minutos. No trabalho de Franca (2016) foi realizado um experimento semelhante, em biorreator, com diferentes tempos de permanência para a variedade de cana-de-açúcar RB966928. O autor também não verificou diferença significativa entre os tratamentos na propagação vegetativa.

A taxa de contaminação deste experimento foi avaliada no final de oito semanas e foram perdidas duas unidades experimentais (5%), o que está abaixo da meta estipulada no objetivo deste trabalho (10%).

Com os resultados dos experimentos 2 e 3, a recomendação de protocolo para otimização de multiplicação de plantas de cana-de-açúcar é realizar a poda e limpeza do material quando houver troca de meio de cultura. Além disso, o biorreator deve funcionar com dois minutos de imersão, oito segundos de permanência de meio de cultura e seis horas de intervalo de troca.

5.3 Enraizamento

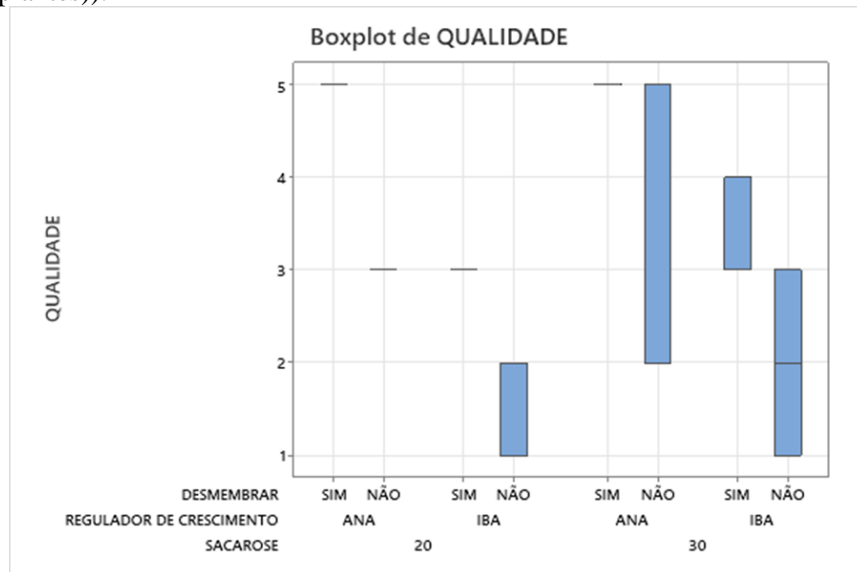
Após doze semanas de início da multiplicação *in vitro* inicia-se o processo de enraizamento. Esta etapa tem duração de três semanas e é essencial para a sobrevivência posterior das plantas em casa de vegetação. Neste experimento foram combinados três fatores: manejo com ou sem desmembramento dos perfilhos, concentração de sacarose (20 ou 30 g/L) e diferentes tipos de reguladores de crescimento (IBA ou ANA). Os resultados estão dispostos na Tabela 10 e FIGURA 8.

Tabela 10 – Resultado da ANOVA com os efeitos dos tratamentos do experimento 4 na qualidade das raízes formadas. Os dados foram coletados após três semanas do início da etapa de enraizamento.

Fonte de var.	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
SACAROSE	1	1,5	1,5	2,57	0,128
REGULADOR DE CRESCIMENTO	1	20,1667	20,1667	34,57	0
DESMEMBRAR	1	13,5	13,5	23,14	0
SACAROSE*REGULADOR DE CRESCIMENTO	1	0	0	0	1
SACAROSE*DESMEMBRAR	1	0,6667	0,6667	1,14	0,301
REGULADOR DE CRESCIMENTO*DESMEMBRAR	1	0	0	0	1
SACAROSE*REGULADOR DE CRESCIMENTO*DESMEMBRAR	1	0,1667	0,1667	0,29	0,6
Erro	16	9,3333	0,5833		

Fonte: Autor (2023)

Figura 8 – *Boxplots* com as distribuições da qualidade das raízes obtidas no experimento 4 após 15 semanas do início de multiplicação *in vitro*. A escala de qualidade varia de 0 a 5, onde 0 é a menor qualidade de raiz (plantas contaminadas e/ou menos 500 clones e/ou ausência de raiz) e 5 de melhor qualidade (raiz presente em $\geq 80\%$ das plantas (≥ 400 explantes)).



Fonte: Autor (2023)

O teste com diferentes reguladores de crescimento foi realizado para determinar o melhor fitorregulador. Segundo Grattapaglia ; Machado (1998), a rizogênese é dividida em indução, iniciação e alongamento, onde as auxinas desempenham um importante papel para a formação de raízes em cana-de-açúcar. Roy e Klabir (2007) realizaram um trabalho de micropropagação de cana-de-açúcar (variedade Isd 32) e obtiveram 90% de explantes enraizados utilizando 2,5 mg/L de ANA. Porém Khan *et al.* (2009) estudou os efeitos dos

reguladores de enraizamento na variedade CPF-237 e constatou que quando utilizava 1,5 mg/L de IBA obtinha cerca de 80% de enraizamento, mas quando empregou ANA na concentração de 0,5 mg/L não atingiu 30% de enraizamento. No trabalho de Lima (2010) foi verificado que a variedade RB92579 é mais responsiva ao enraizamento com o tratamento de 3,0 μ M de IBA, enquanto na variedade RB872552 a concentração de 1,5 μ M de AIA foi a mais adequada para formação de raízes. Portanto, é verificado que diferentes famílias de auxina e concentrações são dependentes do genótipo em questão (PEREIRA; FORTES, 2007).

No presente estudo, a melhor taxa de enraizamento foi alcançada com o regulador ANA (1 mg/L), que gerou raízes mais desenvolvidas (≥ 3 cm) na maior parte das plantas que estavam dispostas no mesmo biorreator. Portanto, o ANA é uma melhor alternativa comparado ao fitorregulador IBA (1 mg/L). Quanto ao teste de manejo do material foi realizado a técnica de desmembramento dos perfilhos no início da etapa de multiplicação. Essa técnica foi aplicada para que as plantas estivessem mais expostas ao meio de cultura, uma vez que na etapa de multiplicação *in vitro* há a tendência dos perfilhos formarem pequenas touceiras. Nesses aglomerados, as plantas competem muito por recursos, diminuindo a disponibilidade de nutrientes e luz para as plantas que ficam mais internas da touceira. A FIGURA 9 demonstra essa intensa competição entre as plantas antes do início do enraizamento.

Figura 9 – Biorreator no final do processo de multiplicação *in vitro* (doze semanas) e início do enraizamento, demonstrando que a densidade das plantas pode prejudicar a formação de raízes no material.



Fonte: Autor (2023)

Plantas em condições de cultura de tecidos necessitam de macro e micronutrientes para o seu crescimento e desenvolvimento. No caso da cultura de tecidos, esses nutrientes são fornecidos pelos componentes de meio de cultura (GEORGE *et al.*, 2008). O enraizamento é uma etapa difícil na propagação vegetativa de muitas plantas (CUSTÓDIO *et al.*, 2004) e requer muitos nutrientes para que o processo possa ocorrer (CALAMAR; DE KLERK, 2002). Assim,

a disposição adequada dos recursos nutricionais para os explantes é essencial para o sucesso da multiplicação *in vitro*.

Com o desmembramento dos perfilhos foi possível constatar que as plantas tiveram mais acesso a luz e nutrientes do meio de cultura. Com isso, o desmembramento resultou numa maior taxa de enraizamento como demonstrado nos resultados da Tabela 10 e FIGURA 8.

A utilização de uma fonte de carbono é essencial para que as plantas consigam se desenvolver, uma vez que elas perdem o potencial fotossintético e diminuem o autotrofismo no ambiente controlado da cultura de tecidos (NICOLOSO et. al., 2003; DIGNART, 2006). Carboidratos, como a sacarose, são essenciais para o enraizamento, pois são transportados para as regiões meristemáticas do rizoma das plantas, onde regulam a iniciação da raiz pela modulação coordenada da expressão gênica e das atividades enzimáticas (PAWLICKI; WELANDER, 1995).

Ferreira, *et al.* (2016) demonstrou para a variedade RB867515 um melhor desenvolvimento do sistema radicular com a utilização de 3% de sacarose, enquanto Franca (2016) determinou que a melhor concentração do componente para formação de raízes em biorreator foi de 70 g/L (equivalente a 7%). Portanto, a melhor concentração de sacarose para enraizamento depende do genótipo. Neste trabalho não foi verificada diferença em uma maior (30 g/L) ou menor (20 g/L) concentração de fonte de carbono para a formação de raízes. Por outro lado, os reguladores de crescimento foram mais importantes para o enraizamento.

Assim, após os resultados obtidos na fase de enraizamento, os melhores parâmetros para um protocolo otimizado de formação de raízes (FIGURA 10) é a utilização do ANA (1 mg/L) como principal regulador de crescimento, desmembramento das plântulas no início da etapa para aumentar a taxa de absorção de nutrientes e a suplementação do meio de cultura com 20 g/L de sacarose como fonte de energia para o processo.

Figura 10 – Raízes formadas após três semanas do início da etapa de enraizamento em biorreator.



Fonte: Autor (2023)

6 CONCLUSÃO

Após a realização de quatro experimentos, testando diferentes aspectos da multiplicação *in vitro* de plantas por biorreator de imersão temporária, foi possível produzir um protocolo otimizado para multiplicação *in vitro* de cana-de-açúcar geneticamente modificada. Esse protocolo consta em produto técnico atrelado a essa dissertação (APÊNDICE A). Por meio desse protocolo, é possível produzir, no período de quinze semanas, mais de quinhentos clones por planta de cana-de-açúcar provenientes do processo transformação genética.

Para a etapa de estabelecimento *in vitro* do explante e início da propagação vegetativa, os melhores resultados foram observados pela utilização de tubo Falcon de 50 mL como container do material propagado. O estudo constatou que, nesse tubo Falcon, não há necessidade de suplementação de aeração por meio de agitação do meio de cultura. Na fase de biorreator a utilização da técnica de poda e limpeza do material foi importante para aumentar a taxa de perfilhamento. Os melhores foram observados na programação do biorreator com dois minutos de imersão, oito segundos de permanência de meio de cultura e seis horas de intervalo de troca. A recomendação para o enraizamento consiste em utilizar o regulador de crescimento ANA, com concentração de sacarose de 20g/L e desmembrar as plântulas no início da etapa para aumentar a taxa de absorção de nutrientes.

Portanto, através dos resultados obtidos, foi possível otimizar o protocolo de multiplicação *in vitro*, com foco em diminuição do tempo em laboratório e aumento de qualidade das mudas de cana-de-açúcar geneticamente modificada.

REFERÊNCIAS

- ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium cultures for banana micropropagation: effect of temporary immersion of explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, p. 55-60, 1993.
- AMBROSANO, G. M. B.; RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; Propagação de mudas de Helicônia em Biorreator de Imersão Temporária. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.1, p.29-35, 2006.
- ARALDI, R.; SILVA, F. M. L.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Florescimento em cana-de-açúcar. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 3, p. 694–702, 2010.
- ARAÚJO, K. L.; CANTERI, M. G.; GILIO, T. A. S.; *et al.* Resistência genotípica e monitoramento da favorabilidade para ocorrência da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 4, p. 271–275, 2013.
- BAIRU, M. W., AREMU, A. O., ; VAN STADEN, J. (2011). Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, 63(2), 147–173.
- BARROS, L. S.; COELHO F; INÁCIO, R., AMARAL, T., AUGUSTO, J.; SCHMILDT, R.; Influência da poda em diferentes alturas no mamoeiro 'Golden'. **Revista Ciência Agronômica [en linea]**. 40(4), 596-601, 2009.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in **Plant Sciences**, v. 24, n. 1, p. 23–58, 2005.
- BURNER, D. M., GRISHAM, M. P., Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane as effected by propagation procedure. **Crop Science**, v. 35, p. 875-880, 1995
- CALAMAR, A., DE KLERK, G. J., Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. **Plant Cell, Tissue Organ Cult** 70(2): 207–212, 2002.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; *et al.* Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, 2011.
- CONAB. Cana-de-açúcar: Acompanhamento da safra brasileira 2020/2021. **Companhia Nacional de Abastecimento**, 2021.
- CRUZ, M. A. L.; SILVA, A. D. C. DA; VEIGA, C. F. DE M.; SILVEIRA, V. Biofábricas para produção de mudas por micropropagação: Estratégia para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar no Rio De Janeiro. **InterScience Place**, v. 1, n. 5, 2015.
- CUSTÓDIO, L., MARTINS-LOUÇÃO, M., ROMANO, A., Influence of sugars on in vitro rooting and acclimatization of carob tree. **Biol Plant** 48(3):469–472, 2004.
- DAMASCO, O. P., GRAHAM, G. C., HENRY, R. J., ADKINS, S. W., SMITH, M. K., GODWIN, I. D., Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types

in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 118-123, 1996.

DANTU, P. K., ; BHOJWAN, S. S.. In Vitro Propagation of Gladiolus: Optimisation of Conditions for Shoot Multiplication. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 1(2), 115–118, 1992.

DE PAULA CIDADE, D. A.; GARCIA, R. D. O.; DUARTE, A. C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 385–391, 2006.

DIGNART, S. L., Luz e sacarose na micropropagação de *cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas, 132 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - **Universidade Federal de Lavras**, Lavras, MG, 2006.

DUTRA, L.F.; DONINI, L.P.; SILVA, S. D. A.; SILVA, N. D. G.; THIEL, F. B.; VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M.; Protocolo de Micropropagação de Cana-de-açúcar, Circular Técnica, **EMBRAPA**, Pelotas, RS, 2011.

FERREIRA, L. T.; SILVA, M. M. DE A.; MACÊDO, C. R. DE; WILLADINO, L. Fonte de luz e concentração de sacarose no cultivo in vitro da cana-de-açúcar (RB 867515). **Plant Cell Culture ; Micropropagation**, v. 12, n. Rb 867515, p. 46–52, 2016.

FRANCA, M. A., Micropropagação de cana-de-açúcar cultivar RB966928, **Universidade Federal do Paraná**, dissertação de mestrado, 64 páginas, 2016.

GEORGE, E.F., HALL, M. A., KLERK, G. J. D., The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. **Plant propagation by tissue culture** pp 65–113, 2008.

GILLIHAM, M.; ABLE, J. A.; ROY, S. J. Translating knowledge about abiotic stress tolerance to breeding programmes. **Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 898–917, 2017

GONZAGA, G. B. M. Avaliação do crescimento inicial da cana-de-açúcar, variedade RB867515, sob efeito de bactérias endofíticas. **Universidade Federal de Alagoas**, Dissertação de Mestrado, 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, p. 183-260, 1998

HÄRTER, A.; Seleção precoce no melhoramento genético de cana-de-açúcar para tolerância a estresses abióticos. **Universidade Federal do Paraná**, Tese de doutorado, 2021.

HEINZ, D. J., MEE, W. P. Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. **American Journal of Botany**, v. 58, n. 3, p. 257-262, 1971.

HENRY, R. J.; KOLE, C. **Genetics, genomics and breeding of sugarcane**. 2010.

IAA/PLANALSUCAR. COSUL., Micropropagação de mudas sadias de cana-de-açúcar

através da técnica de cultura de meristema apical. In: **Seção de Fisiologia**, Relatório Anual, 1983.

INMAN-BAMBER, N. G.; LAKSHMANAN, P.; PARK, S. Sugarcane for water-limited environments: Theoretical assessment of suitable traits. **Field Crops Research**, v. 134, p. 95–104, 2012.

IRVINE, J. E., The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture II. Evidence for vegetative and genetic transmission, epigenetic effects and chimeral disruption. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p. 115-125, 1991.

IRVINE, J. E., BENDA, G.T.A, LEGENDRE, B. L., MACHADO JUNIOR, G. R., The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 3, p. 201-209, 1984

KAUP, F. The Sugarcane Complex in Brazil: The Role of Innovation in a Dynamic Sector on its Path Towards Sustainability. Cham: **Springer International Publishing**, 2015.

KEARBAUY, G.B.; Fisiologia vegetal. 2 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 452 p., 2008.

KHAN, S.A. *et al.* Effect of cytokinins on shoot multiplication in three elite sugarcane varieties. **Pakistanian Journal. Botany**, 41(4): p. 1651-1658, 2009.

LARKIN, P. J., ; SCOWCROFT, W. R., Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. In **Theoretical and Applied Genetics**, Vol. 60, Issue 4, pp. 197–214, 1981.

LEE, T. S. G.; BRESSAN, E. A.; SILVA, A. D. C. DA; LEE, L. L. Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos. **Ornamental Horticulture**, v. 13, n. 0, p. 2002–2010, 2007.

LIMA, G. V. M., Ação de auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento in vitro de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Dissertação de mestrado, 96 páginas, 2010.

MARCATO, A. R.; MARTINES, C. DA C.; GONÇALVES, J. V.; FAZIÃO, L. P. Avaliação dos diferentes meios de propagação de cana-de-açúcar para formação de mudas pré-brotadas (MPB). **Centro Universitário Católica Salesiano Auxilium**, Trabalho de conclusão de curso-Engenharia Agrônômica, 2018.

MARTINS, C. R.; CARVALHO, A. C. P. P. DE. Avanços da Cultura de Tecidos na Micropropagação de Plantas. **III Ciclo de palestras sobre cultivo in vitro de plantas**, p. 28–32, 2012.

NICOLOSO, F.T. et al, Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento e plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.84-90, 2003.

OLIVEIRA, M. H. R. DE. Produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar sob irrigação

- localizada, **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Ceres**, Dissertação de Mestrado, 2019.
- OLIVEIRA, M. L., *et al.* Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária, **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, 2014.
- PAWLICKI, N., WELANDER, M., Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork, **Plant Sci** 106(2): 167–176, 1995.
- PEREIRA, A. M. S; SOUZA, A. V.; Enraizamento de plantas cultivadas in vitro; **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.
- PEREIRA, J. E. S., FORTES, G. R. L., Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **EMBRAPA, Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.
- PHILLIPS, R. L., KAEPLER, S.M, PESCHKE, V.M., Do we understand somaclonal variation? Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. In: **International Congress on Plant Tissue and Cell Culture**, Amsterdam, 1990.
- ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. Cultivo Mínimo. Árvore do conhecimento de Cana-de-Açúcar. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_85_22122006154841.html> Acesso em: 10.out. 2021.
- ROY, P.K; KABIR, M.H. In vitro mass propagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) var. Isd 32 trough shoots tips and folded leaves culture. **Biotechnology**, v. 6, p. 588-592, 2007.
- SANTOS, J. A., Estudo da instabilidade cromossômica em cultura de longa duração de calos de milho. Piracicaba, 172p. Tese (Mestrado) - **Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Universidade de São Paulo, 1995.
- SATO, M.; BAGCHI D.; TOSAKI, A.; DAS, D.K., Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.31, n.6, p.729737, 2001.
- SCHMIDT, F. L.; EFRAIM, P.; BIASI, L. C. K.; FERREIRA, R. E. **Pré-processamento de frutas, hortaliças, café, cacau e cana de açúcar**. 2015.
- SILVA, J. C., Tecnologias para produção de mudas de cana-de-açúcar. **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Ceres**, Dissertação de Mestrado, p. 76, 2017.
- SILVAROLLA, M. B. Plant genomic alterations due to tissue culture. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44, n. 5, p. 329-335, 1992
- THOMAS, A. L.; Desenvolvimento da planta de cana-de-açúcar. **Faculdade de**

Agronomia/UFRGS, livro Cana-de-açúcar, p. 56, 2015.

ZHANG, B. Q.; YANG, L. T.; LI, Y. R. Physiological and biochemical characteristics related to cold resistance in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 17, n. 1, p. 49–58, 2015.

APÊNDICE A - Produto técnico atrelado

Protocolo de multiplicação *in vitro* de cana-de-açúcar geneticamente modificada via Biorreator de Imersão Temporária

Carlos Queiroz Pelaio

Este protocolo foi desenvolvido através dos resultados obtidos do projeto de mestrado do autor, no âmbito do Programa de Pós-Graduação Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA (Universidade Federal de Lavras), realizado no CTC (Centro de Tecnologia Canavieira).

1. Princípio do Método

A multiplicação *in vitro* é uma técnica que possibilita a obtenção de grande número de explantes a partir de uma planta matriz, em curto espaço de tempo e área reduzida.

2. Equipamentos e Materiais

2.1 Equipamentos

- a. Câmara de fluxo laminar;
- b. Esterilizador de pinças;
- c. Luxímetro;
- d. Biorreator de Imersão Temporária.

2.2 Materiais

- a. Pinças;
- b. Tesouras;
- c. Bisturis;
- d. Papéis autoclavados;
- e. Etiquetas de identificação das plantas;
- f. Tubos Falcon estéreis;
- g. Suportes para frascos/tubos Falcon;
- h. Sacos de autoclave;

- i. Caixas de descarte;
- j. Suporte de pinça.

3. Reagentes e Soluções

3.1 Reagentes

- a. Meio de cultura.

3.2 Soluções

- a. Solução de álcool 70%.

4. Generalidades

- a. Utilizar EPI's indicados abaixo para a atividade:

- Sapato de segurança;
- Jaleco;
- Touca;
- Luvas;
- Máscara.

- b. Todo resíduo produzido na operação deve ser encaminhado para descarte e inativação, de acordo com as normas de Biossegurança para manipulação de Organismo Geneticamente Modificado (OGM) não desregulamentado.

5. Metodologia

5.1 Meios de cultura

O meio de cultura das fases de multiplicação (Tabela 1) possui a seguinte composição:

Tabela 1: Meio de cultura para as fases de multiplicação *in vitro*

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Sacarose	20 g/L
SAL MS	4,3 g/L
Kinetina	1 mg/L
BAP	0,2 mg/L

O meio de cultura da fase de enraizamento (Tabela 2) é composto por:

Tabela 2: Meio de cultura para as fases de enraizamento

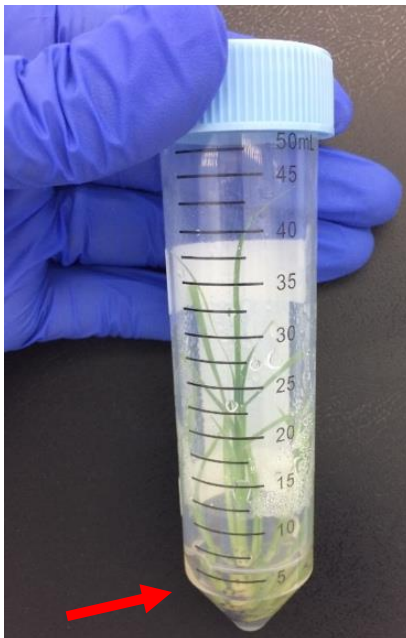
COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Sacarose	20 g/L
SAL MS	4,3 g/L
ANA	1 mg/L

Para o preparo de meio de cultura primeiramente devem ser autoclavados por 20 minutos a 120°C os componentes sacarose, Sal MS e água destilada. Após o resfriamento, adicionar os reguladores de crescimento a fim de evitar degradação das moléculas.

5.2 Fase de 1 a 5 clones (início multiplicação)

- a. Dentro do fluxo laminar podar raízes e folhas mais externas da planta matriz e remover cuidadosamente os perfilhos.
- b. É de extrema importância a limpeza da base da planta matriz de forma a garantir a pureza do material a ser iniciado no processo de multiplicação. Em seguida, transferir as plantas para tubos estéreis, adicionar aproximadamente 5 ml (+/- 2 ml) (FIGURA 1) de meio de cultura específico (Tabela 1) para estimular o perfilhamento e acondicioná-las na sala de crescimento sob temperatura de 28 °C ± 2 °C com aproximadamente 3000 lux.

Figura 1 - A seta indica volume de meio de cultura a ser adicionado em tubo Falcon (± 5 ml), durante a fase de Multiplicação de 1 a 5 clones.



- c. Para descarte do meio de cultura líquido contido no tubo, verter cuidadosamente o meio antigo em um béquer dentro do fluxo laminar, protegendo se necessário a planta com uma pinça estéril para evitar que caia.
- d. Sobre uma superfície estéril, na câmara de fluxo, realizar a poda e a limpeza da parte aérea quando necessário com o auxílio de pinças e tesouras igualmente estéreis.
- e. Colocar a planta novamente no tubo, adicionar o meio de cultura e fechar.
- f. Acondicionar na sala de crescimento sob temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em condições de luminosidade de 3000 lux.
- g. As trocas de meio de cultura devem ser feitas em intervalos semanais.
- h. Os explantes devem ser endereçados para Biorreator de Imersão Temporária (BIT) a partir de 4 semanas do início do processo.

5.3 Multiplicação: 6 a 500 clones (processo de biorreator)

- a. Selecionar o material vegetal que será introduzido no biorreator. O material deve estar livre de contaminação, sem presença de necrose e oxidação.
- b. Levar o biorreator para dentro do fluxo laminar, borrifando álcool 70% em todas as partes. Com auxílio de uma pinça, introduzir o material vegetal.

- c. As trocas de meio de cultura devem ser realizadas no prazo de 2 semanas e em cada troca deve-se podar o material e limpá-lo removendo as folhas necrosadas e oxidadas.
- d. Os parâmetros de funcionamento do biorreator devem ser os seguintes: tempo de imersão de 2 minutos, 8 segundos de permanência de meio de cultura e 6 horas de intervalo de troca.
- e. A multiplicação das plântulas no biorreator deve ocorrer por 8 semanas.

5.4 Enraizamento

- a. Trocar o reservatório contendo meio de cultura específico para estimular o enraizamento (abela 2).
- b. As trocas de meio de cultura devem ser feitas em intervalos de 2 semanas e realizar o desmembramento dos perfilhos a fim de disponibilizar nutrientes e luz para a maior parte das plântulas no momento da troca.
- c. Os parâmetros do biorreator mantem-se os mesmos da fase de multiplicação: tempo de imersão de 2 minutos, 8 segundos de permanência de meio de cultura e 6 horas de intervalo de troca.
- d. Após o prazo de 3 semanas, enviar os explantes para a casa de vegetação.

6. Treinamento

O protocolo obtido através do trabalho acadêmico “Otimização de protocolo de multiplicação *in vitro* de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) geneticamente modificada” foi repassado a dois colaboradores da empresa CTC, por meio de treinamento realizado na data 26/08/2022 conforme a Imagem 1:

Imagem 1: Treinamento dos colaboradores do CTC no protocolo de otimização da fase de multiplicação *in vitro* de cana-de-açúcar

