



GABRIELA FERREIRA NOGUEIRA

**REGENERAÇÃO, CONSERVAÇÃO *in vitro* E
ESTABILIDADE GENÔMICA EM CANA-DE-
AÇÚCAR**

LAVRAS – MG

2013

GABRIELA FERREIRA NOGUEIRA

**REGENERAÇÃO, CONSERVAÇÃO *in vitro* E ESTABILIDADE
GENÔMICA EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

Coorientador

Pesq. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Nogueira, Gabriela Ferreira.

Regeneração, conservação *in vitro* e estabilidade genômica em
cana-de-açúcar / Gabriela Ferreira Nogueira. – Lavras : UFLA,
2013.

184 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. *Saccharum* spp. 2. Organogênese. 3. Embriogênese somática.
4. Criopreservação. 5. Citometria de fluxo. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 633.6123

GABRIELA FERREIRA NOGUEIRA

**REGENERAÇÃO, CONSERVAÇÃO *in vitro* E ESTABILIDADE
GENÔMICA EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 02 de abril de 2013.

Prof. Dr. Adriano Teodoro Bruzi	UFLA
Pesq. Dr ^a . Milene Alves de Figueiredo Carvalho	EMBRAPA
Dr ^a Claudinéia Ferreira Nunes	EPAMIG
Dr ^a Leila Aparecida Salles Pio	UFLA

Prof. Moacir Pasqual
(Orientador)

Pesq. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira
EMBRAPA
(Coorientador)

**LAVRAS – MG
2013**

Aos meus pais Wagner Nogueira e Clara Ferreira Nogueira,

OFEREÇO

*À minha família e amigos,
pelo apoio, carinho e incentivo.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida e tornar os meus sonhos possíveis.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade concedida para a realização da Pós-Graduação.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade de execução dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus queridos pais, Wagner e Clara, pelo apoio incondicional, força e incentivo. Sem vocês nada disto seria possível!

Ao meu irmão Eugênio e todos os familiares que muito me apoiaram e sempre acreditaram em mim.

Ao Luca por ser uma pessoa tão especial e presente em minha vida. Obrigada pelo incentivo e, principalmente, por ter compreendido todas as minhas ausências.

Ao meu orientador Prof. Moacir Pasqual pelo apoio, credibilidade e confiança durante todos esses anos.

Ao meu coorientador Jonny pela confiança, amizade e por ter me acolhido tão bem em Brasília.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Adriano Bruzi, Dra. Claudinéia Ferreira Nunes, Pesq. Dra. Milene A. de Figueiredo Carvalho, Dra. Leila Aparecida Pio, Pesq. Dra. Ester Alice Ferreira.

Aos professores, funcionários e amigos do Setor de Fisiologia Vegetal pela amizade e convivência.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da UFLA, em especial, a Leila e a Ana Catarina pela ajuda na execução dos trabalhos de citometria.

Aos grandes e velhos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal.

Aos amigos de LCT II – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela amizade, risadas e por fazer os meus dias mais agradáveis.

A Zan pela amizade, conselhos e incontáveis ajudas no laboratório.

A Patrícia e Mariana pelo carinho, companheirismo e convivência.

Ao Fausto, Lara, Marcelo, Ana Carla, Grazi e Karla pela amizade e apoio.

A Ana Luiza, Dallyane, Flávia, Marina e Raquel pelo apoio, carinho e por me mostrarem o verdadeiro significado da palavra amizade.

Aos amigos de Lavras e Brasília pelas alegrias, apoio e por estarem sempre presentes em minha vida.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento de mais uma etapa importante da minha vida.

Meus sinceros agradecimentos!!!

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!” (*Mahatma Ghandi*)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial organogênico e embriogênico de variedades brasileiras de cana-de-açúcar, a taxa de multiplicação, a tolerância ao congelamento e ao armazenamento *in vitro* por crescimento mínimo, além de analisar a estabilidade genômica por citometria de fluxo dos materiais regenerados e conservados. Inicialmente, ápices caulinares foram inoculados em meio de MS suplementado com 5,0 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de KIN para estabelecimento do material *in vitro*. Em seguida, dez variedades foram avaliadas quanto a taxa de multiplicação em meio contendo 0,2 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de KIN por oito subcultivos consecutivo. A consistência do meio e a estabilidade genômica também foram verificadas. Para a embriogênese, quatorze variedades foram avaliadas quanto a formação de calos em meio de indução contendo 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e taxa de regeneração em meio suplementado com 1,86 mg L⁻¹ de ANA e 0,09 mg L⁻¹ de BAP. A capacidade morfogênica foi avaliada durante 3 subcultivos. A conservação dos genótipos ocorreu em meio constituído de ½MS e 30 g L⁻¹ de sorbitol, acrescido ou não de ABA, a 18 °C. A quantidade de DNA foi verificada por citometria de fluxo. Criopreservação de ápices caulinares por meio da técnica *droplet vitrification* também foi realizada. De maneira geral, em todos os experimentos realizados, as respostas variaram entre as variedades. Na organogênese constatou-se regeneração tanto pela via direta como indireta. Dentre as 22 variedades, 18 apresentaram potencial organogênico. A taxa de multiplicação *in vitro* foi influenciada pela consistência do meio (líquido e semissólido), ademais, verificou-se que subcultivos consecutivos induziram a formação de variações morfológicas nos explantes e uma taxa de 30% de variação no conteúdo de DNA. O processo embriogênico foi assíncronico, mas a partir da sexta semana de cultivo já foi possível observar a formação de plantas. A maioria das variedades manteve a capacidade morfogênica no tempo, embora tenha se observado um retardamento do processo regenerativo. Na conservação, o meio sem a presença de ABA foi o que proporcionou as maiores taxas de sobrevivência. A recuperação do crescimento foi rápida, todavia, através da citometria de fluxo, observou-se uma redução na quantidade relativa de DNA estimada aos doze meses de conservação. Na criopreservação, constatou-se taxas de sobrevivência de 20 e 10% dos explantes, quando antes do congelamento, os ápices foram desidratados por 20 e 30 minutos em PVS 2, respectivamente. A diversidade dos resultados encontrados podem auxiliar os programas de melhoramento genético da cultura, ou então, acelerar a distribuição de materiais promissores, ou mesmo, conservar a variabilidade genética da espécie.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Organogênese. Embriogênese Somática. Criopreservação. Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the organogenic and embryogenic potential of Brazilian varieties of sugarcane, multiplication rate, tolerance to freezing and slow-growth *in vitro* storage, besides analyzing the genomic stability by flow cytometry of the regenerated and conserved material. Initially, stem apices were cultured on MS medium supplemented with 5.0 mg L⁻¹ ANA and 0.5 mg L⁻¹ of KIN to establish the material *in vitro*. Subsequently ten varieties were evaluated regarding the multiplication rate in medium containing 0.2 mg L⁻¹ BAP and 0.1 mg L⁻¹ KIN for eight consecutive subcultures. The consistency of the medium and genomic stability were also verified. For the embryogenesis, fourteen varieties were evaluated for calli formation in induction medium containing 3.0 mg L⁻¹ 2,4-D and regeneration frequency in medium supplemented with 1.86 mg L⁻¹ ANA and 0.09 mg L⁻¹ BAP. The morphogenic capacity was evaluated along three subcultures. The preservation of genotypes occurred in medium consisting of ½MS and 30 g L⁻¹ sorbitol with or without added ABA, at 18 °C. The amount of DNA was verified by flow cytometry. Cryopreservation of shoot tips through droplet vitrification technique was also performed. In general, in all experiments, responses varied significantly among varieties. In the organogenesis, regeneration was observed by the direct route as well as the indirect. Among the 22 varieties, 18 had organogenic potential. The *in vitro* multiplication rate was influenced by the consistency of the medium (liquid or semi-solid), furthermore, we found that consecutive subcultures induce the morphologic variations in explants. There was a 30% variation rate in the relative amount of DNA starting from the 4th subculture. The embryogenic process was asynchronous, but from the sixth week of cultivation, it was already possible to observe the formation of plants. Most of the varieties maintained morphogenic capacity in time, although we observed a slowing of the regenerative process. Regarding preservation, the medium without ABA was that which provided the highest survival rates. The growth recovery was rapid, however, through flow cytometry, we observed a decrease in the relative amount of DNA estimated at twelve months of storage. In the cryopreservation, a rate of 20 and 10% survival of explants was found when prior the freezing the apices were dehydrated for 20 to 30 minutes in PVS 2, respectively. The diversity of the results can assist the culture breeding programs, or else accelerate the distribution of promising materials, or even preserve the genetic variability of the species.

Key words: *Saccharum* spp. Organogenesis. Somatic Embryogenesis. Cryopreservation. Flow Cytometry.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	A cultura da cana-de-açúcar	16
2.2	Cultivo <i>in vitro</i>	18
2.2.1	Organogênese	21
2.2.2	Embriogênese somática.....	22
2.3	Variação somaclonal	24
2.4	Citometria de fluxo	26
2.5	Conservação <i>ex situ</i> dos recursos genéticos	28
2.5.1	Conservação <i>in vitro</i>	29
2.5.2	Criopreservação	31
	REFERÊNCIAS	37
	CAPÍTULO 2 POTENCIAL ORGANOGÊNICO, TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO E ESTABILIDADE GENÔMICA POR CITOMETRIA DE FLUXO EM CANA-DE-AÇÚCAR	49
1	INTRODUÇÃO.....	52
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1	Potencial organogênico de variedades brasileiras de cana-de- açúcar	55
2.1.1	Análise histológica.....	58
2.2	Taxa de multiplicação <i>in vitro</i>	59
2.2.1	Estabilidade genômica por meio da citometria de fluxo.....	60
2.2.2	Enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização em casa de vegetação.....	62
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64

3.1	Potencial organogênico das variedades de cana-de-açúcar e análise histológica	64
3.2	Taxa de multiplicação em meio líquido e semissólido.....	74
3.2.1	Estabilidade genômica por meio da citometria de fluxo.....	91
3.2.2	Enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização em casa de vegetação.....	96
4	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	106
CAPÍTULO 3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE VARIEDADES BRASILEIRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR E ANÁLISE MORFO-HISTOLÓGICA DE ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO		
1	INTRODUÇÃO.....	118
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	120
2.1	Determinação do explante para a indução da embriogênese somática	120
2.2	Potencial embriogênico das variedades brasileiras de cana-de-açúcar.....	121
2.3	Análise histológica	123
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
3.1	Determinação do explante para a indução da embriogênese somática	124
3.2	Potencial embriogênico das variedades brasileiras de cana-de-açúcar.....	127
3.3	Análise histológica.....	140
4	CONCLUSÕES	145
	REFERÊNCIAS	146
CAPÍTULO 4 CONSERVAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO <i>in vitro</i> DE ÁPICES CAULINARES DE CANA-DE-AÇÚCAR		
1	INTRODUÇÃO.....	154
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	158

2.1	Conservação <i>in vitro</i> de germoplasma de cana-de-açúcar por crescimento mínimo	158
2.1.1	Recuperação do crescimento	160
2.1.2	Análise da estabilidade genômica por citometria de fluxo	161
2.2	Criopreservação de ápices caulinares de cana-de-açúcar pela técnica <i>Droplet vitrification</i>	162
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	165
3.1	Conservação <i>in vitro</i> de germoplasma de cana-de-açúcar por crescimento mínimo e recuperação do crescimento.....	165
3.1.1	Análise da estabilidade genômica por citometria de fluxo	176
3.2	Criopreservação de ápices caulinares de cana-de-açúcar pela técnica de <i>Droplet vitrification</i>	181
4	CONCLUSÕES.....	188
	REFERÊNCIAS.....	189

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biocombustíveis a partir de recursos renováveis é essencial para a sustentabilidade da economia mundial, preservação do meio ambiente e mitigação dos efeitos de emissão do CO₂ (MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009), considerado o principal gás causador do efeito estufa e das mudanças climáticas globais (CHENG; TIMILSINA, 2011).

No Brasil, o etanol tem sido produzido por processos industriais de fermentação alcoólica desde o começo da década de 20, mas foi somente após a crise do petróleo em 1973 que o país passou a investir maciçamente no aumento de produção. Em novembro de 1975, o governo lançou o Programa Pró-Álcool com objetivo de reduzir o preço dos combustíveis e a dependência de importação do petróleo (AMORIM et al., 2011).

Desde então, uma quantidade significativa de etanol e biodiesel são produzidos como biocombustíveis para substituir parcialmente a gasolina e o diesel no setor de transportes (CHENG; TIMILSINA, 2011). E para atender a demanda de mercado nacional, pesquisas têm sido cada vez mais focadas no desenvolvimento de culturas com alta produção de biomassa, visando a maior produção de bioenergia (WACLAWOVSKY et al., 2010).

O etanol é produzido a partir da fermentação de açúcares como sacarose e amido (WACLAWOVSKY et al., 2010). Nos Estados Unidos, a produção é quase totalmente provinda do amido de milho, o qual é convertido à glucose através da adição de enzimas do grupo das amilases e glucoamilases. Já no Brasil, o caldo da cana-de-açúcar é a matéria-prima preferencial, respondendo por cerca de 80% da produção (SAINZ, 2009).

Atualmente, cerca de 430 usinas e destilarias processam mais de 600 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por safra, produzindo cerca de 27 bilhões de litros de etanol e 38,7 milhões de toneladas de açúcar (AMORIM et al., 2011). Até a presente data, a produção de etanol, a partir da cana-de-açúcar, tem sido considerada uma tecnologia bem sucedida, com avanços consideráveis nos mercados de combustíveis. Entretanto, com o crescimento e expansão da cultura, torna-se evidente a necessidade do país em desenvolver novas tecnologias para o setor sucroalcooleiro, com destaque à melhor qualidade de matéria prima entregue às indústrias e ao aumento da produtividade por área (SAINZ, 2009; TAO; ADEN, 2009).

Sabe-se que a domesticação da cana-de-açúcar é relativamente recente e pouco do potencial genético dessa espécie e de seus parentes selvagens foram obtidos pelos programas de melhoramento genético (DILON et al., 2007). Entretanto, na última década, a melhor compreensão e manipulação do genoma da cana-de-açúcar permitiram aumentos consideráveis no rendimento e produtividade da cultura, por meio do desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a diferentes condições climáticas, resistentes a pragas, mais eficientes no uso da água e nutrientes, entre outras características agronômicas desejáveis (LAKSHMANAN et al., 2005).

Atualmente, as variedades de cana-de-açúcar cultivadas são o resultado do cruzamento interespecífico entre *Saccharum officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*. A cana-de-açúcar apresenta um dos genomas mais complexos do reino vegetal, com um número somático de cromossomos que varia entre 70-120 (D'HONT et al., 1996). Esta complexidade dificulta a aplicação de técnicas convencionais de melhoramento

genético para a cultura visando o desenvolvimento de novas cultivares com maior produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos. Desta forma, tal complexidade e fatores somados tornam a cana-de-açúcar uma excelente candidata para que técnicas biotecnológicas sejam aplicadas.

Nesse contexto, as diferentes técnicas da cultura de tecidos podem ser importante aliadas, seja para o desenvolvimento mais rápido de novas cultivares, seja para auxiliar programas de melhoramento genético da cultura, ou então, para acelerar a distribuição de materiais promissores, ou mesmo, conservar a variabilidade genética da espécie, uma vez que, até o momento, a conservação de germoplasma de cana-de-açúcar é feita a partir de coleções em bancos de germoplasma mantidos em campo (ROACH, 1995). Para tanto, os processos de estabelecimento, multiplicação e regeneração *in vitro* devem estar completamente elucidados.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial organogênico e embriogênico de variedades brasileiras de cana-de-açúcar, determinar a taxa de multiplicação *in vitro* e a tolerância ao congelamento e ao armazenamento *in vitro* por meio da técnica de crescimento mínimo, além de analisar a estabilidade genômica por citometria de fluxo dos materiais regenerados e conservados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma importante cultura no mundo tropical devido ao seu alto conteúdo de açúcar armazenado no colmo. Originou-se no sudeste da Ásia e na Nova Guiné (DILLON et al., 2007) e foi introduzida no Brasil durante o período colonial, por volta de 1502. Atualmente, é bastante difundida no país e representa a principal matéria-prima para a fabricação do açúcar, do etanol e aguardente.

A área cultivada com cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 está estimada em 8.520,5 mil hectares, distribuídas em praticamente todos os estados brasileiros. O estado de São Paulo é o maior produtor com 51,87% (4.419,46 mil hectares), seguido por Goiás com 8,52% (725,91 mil hectares) e Minas Gerais com 8,47% (721,86 mil hectares). A Região Nordeste ocupa a segunda posição no ranking da produção nacional com mais de 64 milhões de toneladas, correspondendo a aproximadamente 12% da produção nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2012).

A espécie, pertencente à família *Poaceae*, também é caracterizada pelo alto conteúdo de compostos químicos valiosos para as indústrias, alta eficiência fotossintética e é uma das plantas mais eficientes no uso da água (HELLER-USZYNSKA et al., 2011).

É uma planta com metabolismo C4 apresentando um mecanismo concentrador de CO₂ que a torna mais competitiva sob condições de estresse,

tais como altas temperaturas, altas intensidades luminosas e baixa disponibilidade de água, pois consegue manter altas taxas fotossintéticas mesmo quando os estômatos estão fechados e limitar o fluxo de carbono por meio da via fotorrespiratória (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Além disso, a espécie representa um sistema único de fonte-dreno por duas razões: 1) o armazenamento de assimilados em altas concentrações é na forma de sacarose, um soluto osmoticamente ativo, enquanto muitas outras plantas armazenam polissacarídeos insolúveis como o amido; 2) o armazenamento ocorre nos tecidos parenquimáticos do caule (colmo) e não nos órgãos dreno terminais (McCORMICK; WATT; CRAMER, 2009). Isso torna o conteúdo de sacarose um dos principais fatores utilizados na seleção de novas cultivares (LINGLE et al., 2009), que inicialmente surgiram do cruzamento entre *S. officinarum* L. e *S. spontaneum* L. (CASU et al., 2005).

Esta hibridização interespecífica foi caracterizada pela transmissão cromossômica assimétrica, o que resultou em cultivares altamente poliploides e geneticamente complexas, com maior conteúdo de sacarose e resistência a patógenos, além do aumento no vigor e na adaptabilidade da espécie (PIPERIDIS; PIPERIDIS; D'HONT, 2010). Desde então, iniciaram-se os cruzamentos entre híbridos para obtenção das cultivares atuais e cruzamentos com espécies aparentadas para ampliação da variabilidade genética (DILLON et al., 2007).

Entretanto, como a cana-de-açúcar apresenta, principalmente, reprodução vegetativa por meio de colmos, esse processo é trabalhoso e demorado, levando de 10 a 14 anos desde a obtenção dos híbridos, passando

pelas sucessivas seleções e, finalmente, as experimentações de campo (ALVAREZ et al., 1983).

Para superar essas restrições, pesquisadores focaram no aprimoramento e desenvolvimento de novas tecnologias potencialmente eficientes que auxiliaram efetivamente as técnicas de melhoramento genético convencional e aceleraram a obtenção das cultivares modernas de cana com características agronômicas desejáveis.

Nesse contexto, as técnicas de cultivo *in vitro* se destacaram com inúmeras vantagens em relação à multiplicação em campo e, atualmente, são fundamentais para os programas de melhoramento genético de plantas (CIDADE et al., 2006). Dentre as vantagens, destacam-se a alta taxa de multiplicação de clones, a produção de material livre de doenças em curto espaço de tempo, a geração de somaclones, a conservação e o intercâmbio de germoplasma (SNYMAN; NKWANYANA; WATT, 2011).

2.2 Cultivo *in vitro*

A técnica de cultura de tecidos refere-se ao cultivo *in vitro* de explantes em meio de cultura com composição química determinada e em condições assépticas e controladas de luminosidade e temperatura. Esta tecnologia está baseada na totipotencialidade das células e explora as condições que promovem a divisão celular e reprogramação genética no ambiente *in vitro*, em resposta a um estímulo determinado. Desenvolvida no início dos anos 1960, a cultura de tecidos de plantas tornou-se um procedimento padrão para a biotecnologia moderna (LOYOLA-VARGAS; VÁZQUEZ-FLOTA, 2006).

A cultura de tecidos com a cana-de-açúcar iniciou-se no Havaí em 1961. Desde então, diversas técnicas de regeneração *in vitro* e micropropagação avançaram rapidamente, e hoje estão sendo utilizadas comercialmente por países produtores para a propagação em larga escala de novas variedades de cana-de-açúcar (CHENGALRAYAN; ABOUZID; GALLO-MEAGHER, 2005; LAKSHMANAN, 2006).

Os protocolos já descritos para a espécie têm como base processos de regeneração *in vitro* a partir de meristemas apicais e axilares, ápices caulinares e tecidos de folhas imaturas, por processos de embriogênese somática e organogênese em cultivo convencional estático ou pela utilização de biorreatores de imersão temporária (HO; VASIL, 1983; GARCIA et al., 2007; MORDOCCO; BRUMBLEY; LAKSHMANAN, 2009).

Apesar de alguns protocolos já estarem bem estabelecidos, estes não se aplicam universalmente a todas as variedades de cana-de-açúcar, uma vez que diversos fatores influenciam a regeneração e a estabilidade genética das plantas *in vitro*, tais como genótipo, tipo de explante, condições de cultivo e combinação destes (SNYMAN et al., 2011).

Cidade et al. (2006) relataram diferenças entre métodos de cultivo (meio semissólido, líquido estacionário e líquido sob agitação) na morfogênese *in vitro* de cana-de-açúcar. Estes autores verificaram que o cultivo de brotos de cana-de-açúcar em meio líquido sob agitação possibilita aumentos de até 100% na produção de plantas, em comparação com o cultivo em meio semissólido. Entretanto, uma das limitações do meio de cultura líquido é a alta incidência de hiperhidricidade em alguns genótipos ao longo do cultivo, e são facilmente

verificadas por meio da aparência vitrificada das plantas (SNYMAN; NKWANYANA; WATT, 2011).

Outro aspecto importante é a utilização de plantas de cana-de-açúcar previamente estabelecidas *in vitro* como fonte preferencial de explante. Ao contrário das plantas oriundas do campo, estas apresentam uniformidade fisiológica e constante disponibilidade de material, não requerem desinfestação e usualmente liberam menor quantidade de compostos fenólicos (GARCIA et al., 2007). Além do tipo de explante e sua origem, deve-se também atentar ao tamanho, a polaridade e a sua orientação no meio de cultura, uma vez que estes reagem em resposta a diferentes concentrações de fito-hormônios endógenos e exógenos (LAKSHMANAN et al., 2006).

E esse balanço hormonal entre o explante e o meio de cultura é responsável pela formação e crescimento de diferentes órgãos vegetais. De acordo com Garcia et al. (2007), as vias de regeneração organogênica e embriogênica a partir de um mesmo explante é geralmente relatada em resposta a diferentes reguladores de crescimento ou concentrações do mesmo regulador.

A regeneração de brotos de cana-de-açúcar, por exemplo, pode ser obtida pela organogênese direta por meio da exposição dos explantes a pelo menos uma citocinina e uma auxina, em uma alta razão citocinina:auxina. Mas também pode ser obtida indiretamente, por meio da reorganização do meristema no estágio de calo, também em resposta ao balanço auxina e citocinina para formação de brotos e raízes, respectivamente (SNYMAN et al., 2011).

De maneira geral, o ajuste às condições de cultivo podem fornecer estímulos alternativos para diferentes tipos de células e refinar os sistemas de

regeneração de plantas para a espécie, nas distintas vias morfogênicas (LAKSHMANAN et al., 2006).

2.2.1 Organogênese

A criação de uma nova organização celular nos tecidos e o surgimento de novos órgãos, onde antes eles não existiam, é chamada de organogênese. Esse processo de neoformação de parte aérea e/ou raiz pode ocorrer de duas formas: diretamente de um tecido vegetal (sem a proliferação de calos) ou indiretamente de células indiferenciadas ou desorganizadas (calos) (LEMOS, 2010).

Muitas vezes não é possível fazer uma clara distinção entre as formas direta e indireta, uma vez que é comum a ocorrência simultânea dos dois tipos de organogênese em um mesmo tecido. Além disso, Rocha et al. (2012) demonstraram similaridade na resposta organogênica e características citológicas das células envolvidas em ambas as vias de regeneração a partir de explantes não meristemáticos de *Passiflora edulis*.

Para a cana-de-açúcar, a rota organogênica *in vitro* já foi estabelecida e, na maioria dos relatos, os protocolos foram baseados em plantas oriundas do campo e na regeneração por via organogênica indireta (GARCIA et al., 2007; ELDESSOKY et al., 2011). Entretanto, o risco de variação genética ou somaclonal aumenta quando as plantas originam-se por meio de calos (CID; TEIXEIRA, 2010).

Diante deste contexto, Gill, Malhotra e Gosal (2006) preocuparam-se em desenvolver um protocolo de regeneração para cana-de-açúcar de maneira rápida e direta. Os melhores resultados foram obtidos em meio contendo $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de

ácido naftalenoacético (ANA) e 0,5 mg L⁻¹ de cinetina (KIN) quando em condições de luminosidade.

Já Franklin et al. (2006) desenvolveram outro protocolo eficiente, porém envolvendo duas etapas principais: pré-tratamento em um meio de indução de calo contendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético, seguido da transferência para meio indutor de brotações, contendo cinetina e benzilaminopurina. Estes autores acreditam que o 2,4-D aumenta a eficiência de regeneração tornando um maior número de células competentes.

Contudo, sabe-se que o genótipo, a polaridade e conseqüentemente a orientação do tecido, o tamanho e o estágio de desenvolvimento dos explantes apresentam um papel determinante no potencial organogênico (LAKSHMANAN et al., 2006), variando de espécie para espécie.

2.2.2 Embriogênese somática

A embriogênese somática é o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas. É uma promissora ferramenta para a rápida propagação de clones (LOYOLA-VARGAS; VÁZQUEZ-FLOTA, 2006) e tem sido obtida para um grande número de plantas, incluindo muitos membros da família *Poaceae* (NIEVES et al., 2003).

A embriogênese pode ocorrer por duas vias: direta ou indireta. No primeiro caso a formação do embrião ocorre por meio da diferenciação das células do explante utilizado, gerando uma cópia geneticamente idêntica à planta matriz. Já a embriogênese indireta, envolve uma etapa intermediária de proliferação celular, formação de calo e, posteriormente, a formação dos

embriões somáticos. O processo da embriogênese gera uma estrutura bipolar sem conexão com o explante de origem (CANÇADO et al., 2012).

Para a cana-de-açúcar, Ho e Vasil (1983) foram um dos primeiros a reportarem a embriogênese somática e a regeneração de plantas por meio da via indireta. Esses autores estudaram sistematicamente os fatores que controlam a formação dos calos embriogênicos, os requerimentos nutricionais, a histologia e a ontogenia do desenvolvimento de formação dos embriões somático a partir de segmentos foliares. Três tipos de calos com potenciais morfogênicos distintos foram verificados: calos compactos, calos friáveis e mucilaginoso. De acordo com Basnayake, Moyler e Birch (2011) estes tipos de calos variam entre genótipos, meio de cultura, idade e subcultivos.

Os calos embriogênicos apresentam crescimento rápido, alta atividade metabólica e possuem mais proteínas solúveis, prolina livre, atividade proteolítica e açúcares solúveis em relação aos calos não embriogênicos (NIEVES et al., 2003). A presença de compostos nitrogenados aumenta a produção de embriões somáticos de cana-de-açúcar e favorecem a sua germinação (NIEVES et al., 2008).

Para a maioria dos protocolos descritos, a embriogênese somática da cana-de-açúcar é induzida em resposta a auxina, principalmente o 2,4-D, com concentrações de 2 – 4 mg L⁻¹ sendo mais efetivas (LAKSHMANAN, 2006). Inicialmente forma-se um calo mucilaginoso, seguido por um calo branco compacto nodular que posteriormente se diferencia em embrioides a partir de células individuais, pequenas, de paredes finas, citoplasma denso e com muitos vacúolos e grãos de amido. A regeneração de plantas é alcançada com a

transferência dos calos para meio de cultura, geralmente contendo baixa concentração de auxina (HO; VASIL, 1983).

Entretanto, Garcia et al. (2007) demonstraram que a resposta dos explantes cultivados em presença da auxina é modulada pela luz. Na ausência da luz, a auxina (2,4-D e Picloram) induz a formação de calos embriogênicos. Por outro lado, quando os explantes estão na presença de auxina e mantidos sob condição de luminosidade durante todo o período de cultivo, a regeneração acontece por meio da organogênese direta e/ou indireta. As massas pró-embriogênicas na presença de luz não chegam a atingir o estágio de maturidade.

2.3 Variação somaclonal

O termo variação somaclonal é utilizado para descrever qualquer variação genética e epigenética detectada nas plantas derivadas da cultura de células e tecidos, independente da rota morfogênica ou explante utilizado (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

É um fenômeno causado por fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados ao cultivo *in vitro* (SUPRASANNA et al., 2010). E desde sua primeira observação em 1959, a variação somaclonal continua sendo um dos principais problemas para diversas plantas cultivadas *in vitro* (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011).

A aplicação potencial das técnicas de cultura de tecidos para a propagação clonal de plantas está baseada na estabilidade genética das plantas regeneradas (SUPRASANNA et al., 2010). Como um método de propagação assexual, envolvendo apenas divisões mitóticas, teoricamente não deveria causar

qualquer tipo de variação ao tecido (LARKIN; SCOWCROFT, 1981), que é indesejável para a propagação comercial de plantas e conservação de germoplasma.

Entretanto, o ambiente *in vitro* pode ser mutagênico durante o período de cultura. Os métodos de propagação, o tipo de cultivo, a concentração dos reguladores de crescimento, o número assim como a duração dos subcultivos são alguns dos fatores que podem determinar a frequência de variação (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011).

O cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar muitas vezes apresenta níveis consideráveis de variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; ZUCCHI et al., 2002; RAJESWARI et al., 2009). Estas variações somaclonais podem ocorrer a nível morfológico, fisiológico e bioquímico, bem como, a nível genético. Dentre esses, a variação morfológica é mais facilmente observada através de caracteres como estatura, morfologia foliar, diâmetro, pigmentação, entre outros (HUANG et al., 2012).

Na maioria das vezes, a origem das variações encontradas no ambiente *in vitro* é desconhecida. E embora as mutações na sequência do DNA tenham sido apontadas como causa provável de variação fenotípica, está se tornando cada vez mais claro que o papel tem sido desempenhado pela regulação epigenética (MIGUEL; MARUM, 2011).

A regulação epigenética na variação somaclonal proposta por Bird (2007) envolve a adaptação estrutural de regiões cromossômicas a fim de registrar, sinalizar ou perpetuar os estados de atividade alterados. E está intimamente relacionado com as variações fenotípicas dos indivíduos (MIGUEL; MARUM, 2011). Envolvem, portanto, mecanismos de silenciamento

ou ativação de genes de maneira reversível e não hereditária, ou seja, sem a ocorrência de aberrações cromossômicas ou mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA (KAEPPLER; KAEPPLER; RHEE, 2000).

A metilação do DNA é um dos mecanismos principais de alterações epigenéticas e, normalmente, está relacionada ao silenciamento de genes. Esse processo consiste na modificação covalente do DNA, na qual um grupamento metila (CH_3) é adicionado no carbono 5 de uma citosina resultando na redução da expressão gênica nos locais metilados (MIGUEL; MARUM, 2011).

Os variantes somaclonais podem ser detectados utilizando diversas técnicas biotecnológicas, cada qual com suas peculiaridades. Contudo, na maioria das vezes, são mais facilmente detectadas por meio de métodos moleculares como, por exemplo, as técnicas de RAPD, AFLP, microssatélites, isoenzimas entre outros (SMULDERS; KLERK, 2011).

Atualmente, a técnica de citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada, devido a sua alta precisão e rapidez de análise (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011).

2.4 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo envolve a análise de propriedades de fluorescência e de dispersão da luz de partículas em suspensão, que são obrigadas a interceptar, dentro de um fluxo de fluido, um foco de luz intensa (SHAPIRO, 2004).

As partículas excitadas e a fluorescência emitida são separadas por uma série de filtros óticos e espelhos dicroicos, respectivamente (EECKHAUT;

LEUS; HUYLENBROECK, 2005). Diversos circuitos no interior do aparelho convertem esses sinais fluorescentes em valores digitais, que são armazenados e exibidos na forma de histogramas (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

Devido ao fato de as partículas serem analisadas individualmente e em alta velocidade, grandes populações podem ter o conteúdo de DNA mensurado em um curto espaço de tempo (SHAPIRO, 2004). Por essa razão, a citometria se tornou um excelente método para triagem de ploidia, detecção de mixoploidia e aneuploidia, determinação de vias reprodutivas e estimação do conteúdo de DNA (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

Desde o primeiro relato sobre o estudo de citometria utilizando material vegetal, há aproximadamente 35 anos, vários métodos foram testados a fim de superar as dificuldades para a liberação dos núcleos de maneira intacta (OCHATT, 2008). Atualmente, o protocolo desenvolvido por Galbraith et al. (1983) continua a ser o mais confiável e rápido e, dada a sua simplicidade, permitiu que diversos tipos de explantes fossem analisados (tecidos foliares, embriões, pólen, protoplasto, suspensão celular e calos).

O método envolve basicamente a realização de cortes em uma pequena quantidade de tecido fresco em um tampão adequado de lise, capaz de destruir as membranas celulares e nuclear e, assim, permitir a liberação dos núcleos. Entretanto, devido à heterogeneidade dos materiais vegetais, aspectos como composição do tampão de extração dos núcleos, padrão de referência e o tipo de fluorocromo devem ser otimizados (EECKHAUT; LEUS; HUYLENBROECK, 2005), uma vez que interferem diretamente na qualidade das análises.

Nos dias atuais, a citometria de fluxo tem sido utilizada para fazer distinção entre regenerantes obtidos pelas diferentes técnicas de cultivo *in vitro*.

Nenhuma variação no conteúdo de DNA foi encontrada em plantas de *Olea* sp., *Passiflora* spp. e *Lathyrus* spp. regeneradas e propagadas *in vitro* (BRITO et al., 2010; DA SILVA et al., 2011; OCHATT; CONREUX; JACAS, 2013). Entretanto, ao contrário destes trabalhos, Prado et al. (2010) detectaram variantes somaclonais por citometria de fluxo em plantas de *Vitis vinifera* regeneradas via embriogênese somática.

Para a cana-de-açúcar, até o momento, nenhum trabalho de citometria de fluxo envolvendo plantas regeneradas *in vitro* foi encontrado na literatura.

2.5 Conservação *ex situ* dos recursos genéticos

Os recursos genéticos são definidos como a fração da biodiversidade que tem previsão de uso atual ou potencial. Assim, compreendem as variedades tradicionais, melhoradas, linhas avançadas e os parentes selvagens de espécies cultivadas e, conseqüentemente, são portadores de alelos de grande significado para o melhoramento genético (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO, 1989; ALLEM, 2000).

Atualmente, os recursos genéticos são conservados em bancos e coleções de germoplasma, que são unidades conservadoras de germoplasma de uso imediato ou com potencial de uso futuro. Podem-se conservar nos seus *habitats* naturais (*in situ*), em condições diferentes as do seu *habitat* natural (*ex situ*), ou combinando os métodos de maneira complementar. A seleção de um ou vários métodos depende das necessidades, possibilidades e da espécie em foco (SANTOS; BETTENCOURT, 2002).

A conservação por meio da proteção de áreas naturais deve ser o principal meio para a manutenção desses recursos. Apresenta vantagens em termos de cobertura, viabilidade e sustentabilidade econômica (POSSIEL; SAUNIER; MEGANCK, 1995). Entretanto, a vulnerabilidade das plantas, as intempéries climáticas e os ataques de patógenos em condições de campo têm dificultado a conservação dos recursos genéticos *in situ*.

A conservação *ex situ* é, muitas vezes, a única opção viável para espécies de grande interesse econômico, como é o caso da cana-de-açúcar que apresenta propagação vegetativa por meio de colmos. De acordo com Veiga et al. (2006), essa conservação desdobra-se em várias modalidades entre as quais destacam-se a conservação *in vitro*, as coleções de campo, em câmaras frias e em nitrogênio líquido (-196° C).

A manutenção das espécies fora de seu *habitat* natural tem como principais características: (i) preservar alelos por séculos; (ii) permitir que em apenas um local seja reunido material genético de muitas procedências, facilitando o trabalho do melhoramento genético; (iii) garantir melhor proteção à diversidade intraespecífica (BRASIL, 2011).

2.5.1 Conservação *in vitro*

As técnicas da cultura de tecidos podem ser utilizadas, de maneira geral, para a propagação em larga escala de plantas, seja para pesquisa, reintrodução ou comercialização. Mas também podem ser a base para os bancos de germoplasma *in vitro*, como forma de preservar a diversidade genética,

principalmente quando as sementes não podem ser armazenadas devido à recalcitrância (PENCKE, 2011).

A conservação *in vitro* pode ser feita a partir de mudanças nas condições de cultivo para desacelerar ou suprimir drasticamente o crescimento das células, tecidos e órgãos (ROCA; ARIAS; CHAVÉZ, 1991).

De acordo com Engelmann (2011), o método de crescimento mínimo tem sido utilizado com sucesso para a conservação a curto e médio prazo, principalmente de meristemas e/ou ápices caulinares de muitas espécies, e consiste na redução do crescimento e no aumento dos intervalos entre os subcultivos, sem afetar significativamente a viabilidade dos explantes.

Esta diminuição na atividade metabólica pode ocorrer devido alterações físicas do ambiente (temperatura e luminosidade) e/ou química do meio de cultivo (retardadores de crescimento, componentes orgânicos e inorgânicos) (LEMONS et al., 2002; LIMA-BRITO et al., 2011; SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011).

Uma abordagem amplamente aplicada envolve a adição de agentes osmóticos e/ou redução da temperatura na qual as espécies são mantidas. Em geral, temperaturas entre 15 a 20 °C promovem maiores taxas de sobrevivências, associadas a menor taxa de crescimento, sem mudanças morfológicas aparentes e alterações anatômicas dos tecidos vegetais (PEDROSO et al., 2010; SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011). A baixa temperatura aumenta o intervalo de transferência para novo meio e, muitas vezes, independe do tipo e concentração do carboidrato utilizado (LIMA-BRITO et al., 2011).

Normalmente, agentes osmóticos tais como sacarose, manitol e sorbitol são adicionados ao meio para reduzir-lhe o potencial hídrico e dificultar a

absorção de água e nutrientes (FARIA et al., 2006). Além disso, estes carboidratos podem ser combinados com algum inibidor de crescimento, como ácido abscísico ou ácido salicílico a fim de aumentar a eficiência dos resultados e manter a alta taxa de sobrevivência dos explantes durante período de conservação *in vitro* (KEATMETHA et al., 2006).

Os métodos de conservação *in vitro* são considerados particularmente interessantes para as espécies agrícolas de grande importância econômica (PENNY, 2011). Em condições padrões de cultivo, plantas de cana-de-açúcar *in vitro* crescem rapidamente e consomem a maior parte dos nutrientes do meio em cerca de três a quatro semanas, sendo necessária a repicagem constante dos explantes com a renovação do meio. Entretanto, com a redução do metabolismo por meio de agentes osmóticos e baixa temperatura, as plantas são capazes de permanecerem viáveis por até um ano no mesmo meio de cultura (LEMOS et al., 2002).

De maneira geral, a criação de coleções de plantas sob condições cuidadosamente controladas é conceitualmente simples, mas possuem algumas limitações como a contaminação por micro-organismos e a variação somaclonal ao longo do cultivo (WITHERS, 1991). E para minimizar este risco, o material conservado deve ser monitorado periodicamente quanto à sua estabilidade genética, viabilidade e estado fitossanitário (OLIVEIRA et al., 2000).

2.5.2 Criopreservação

Nas últimas décadas, a tecnologia de criopreservação de plantas tem evoluído rapidamente como a maneira mais promissora no armazenamento em

longo prazo dos recursos genéticos vegetais. Além disso, tem sido considerada a técnica de maior potencial para preservar espécies que se propagam vegetativamente ou que possuem sementes inviáveis, intermediárias ou recalcitrantes (GONZÁLEZ-BENITO; CLAVERO-RAMÍREZ; LÓPEZ-ARANDA, 2004).

Essa técnica caracteriza-se pela manutenção da estrutura vegetal em nitrogênio líquido, seja em estado líquido (-196° C) ou em vapor (aproximadamente -150° C) (WITHERS; ENGELMANN, 1997). Esta temperatura ultra-baixa proporciona uma redução drástica do metabolismo celular, mantendo intacto o material biológico conservado e assegurando-lhe alta estabilidade genética e fisiológica (ENGELMANN, 2004).

A criopreservação pode ser aplicada a uma variedade de materiais vegetativos como, por exemplo, gemas apicais, gemas axilares, embriões zigóticos, embriões somáticos, calos e suspensão celular. Estas potenciais fontes de explantes permitem muitas aplicações possíveis para a técnica, o que torna extremamente difícil definir um protocolo de criopreservação único e com ampla aplicação (SARASAN et al., 2006).

Além disso, sabe-se que o maior desafio para os protocolos de criopreservação é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células. Esses cristais geram uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos aos tecidos (CARVALHO, 2007), resultando em perda da semi-permeabilidade e da compartimentação celular (SANTOS, 2001).

De acordo com Carneiro e Cal-Vidal (2000) a água congelada tem um comportamento peculiar: expande-se ao cristalizar e, ao fundir-se, tem a tendência de recristalizar formando longos e protudentes cristais de gelo. Para

tanto, protocolos convencionais envolvem o pré-tratamento do material biológico a fim de remover parte da água dos tecidos antes de mergulhá-los no nitrogênio líquido (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). Panis; Piette e Swennen (2005) afirmaram que a chave para o sucesso da criopreservação não está com a tolerância ao congelamento, mas com a tolerância à desidratação e sua indução.

Por isso, as técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente estão baseadas na vitrificação (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005), principalmente, devido à praticidade da técnica e à alta percentagem de regeneração (RYYNÄNEN; ARONEN, 2005; WANG; FAN; LIAW, 2005). Este novo procedimento envolve o congelamento induzido pela desidratação das células a temperaturas ultra-baixas por meio da remoção de uma grande parte de água congelável das células, seja através da secagem ao ar ou pela exposição a uma solução de vitrificação altamente concentrada (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

▪ Técnica baseada na vitrificação

A formação de cristais de gelo, sem a redução extrema do conteúdo da água celular, só pode ser prevenida através da vitrificação, que refere-se a passagem da água diretamente da fase líquida para uma fase amorfa ou de vidro, evitando a formação de gelo cristalino (PANIS; LAMBARDI, 2005).

Os primeiros relatos sobre o uso de uma solução de vitrificação em tecidos vegetais ocorreu em 1989, a partir de estudos com *Brassica campestris* (LANGUIS et al., 1989) e *Asparagus officinalis* (URAGAMI et al., 1989). Recentemente, esta técnica está bem difundida entre os criobiologistas e o

número de espécies criopreservadas tem aumentado acentuadamente nos últimos anos.

A técnica fundamenta-se no tratamento dos explantes com uma solução de vitrificação altamente concentrada e por períodos de tempo variáveis (de 15 minutos até 2 horas), seguido pela imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C) (PANIS; LAMBARDI, 2005).

As soluções de vitrificação, denominadas de crioprotetores, removem a água osmoticamente das células, alteram as características de congelamento e evitam a cristalização intracelular (VOLKS; WALTERS, 2006; VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006). Sabe-se que essas substâncias devem possuir como propriedades essenciais, uma baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água (GONZALEZ- ARNAO et al., 2008).

Uma grande quantidade de substâncias foram investigadas quanto à atividade crioprotetora e, posteriormente, classificadas quanto a sua eficiência em desidratar as células e estabilizar as proteínas e membranas. (FULLER, 2004; VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006). Fuller (2004) ressaltou que apesar do uso rotineiro, os mecanismos de ação destas soluções sobre as células são ainda pouco compreendidos.

De maneira geral, o sucesso da criopreservação através da vitrificação está no controle dos procedimentos de desidratação e prevenção de injúrias causadas pela toxicidade química ou estresse osmótico excessivo durante o tratamento com as soluções crioprotetoras. Assim, a otimização do tempo e temperatura de exposição é muito importante para se conseguir uma maior taxa de regeneração dos explantes (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

▪ **Técnica *Droplet vitrification***

Os trabalhos baseados na técnica de *droplet vitrification* têm demonstrado aplicabilidade para uma grande variedade de espécies e tecidos (HALMAGYI; PINKER, 2006; SANT et al., 2008; GUZMÁN-GARCÍA; BRADAI; SÁNCHEZ-ROMERO, 2013). De acordo com Panis et al. (2011) a técnica combina a aplicação das soluções de vitrificação altamente concentradas com uma taxa de congelamento e descongelamento ultrarrápido.

Os passos basicamente envolvem a desidratação osmótica dos explantes e o congelamento em uma microgota de solução de vitrificação (PVS) colocada sobre uma tira de papel alumínio, na qual é imersa diretamente em nitrogênio líquido (PANIS, PIETTE; SWENNEN, 2005).

O pequeno volume de crioprotetor (10 a 15 μL) é que caracteriza o principal interesse da técnica em atingir um congelamento e descongelamento extremamente rápido (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Esses são requerimentos essenciais para evitar os danos letais causados pela formação dos cristais de gelo intracelular.

Droplet vitrification é a mais recente técnica de criopreservação desenvolvida (SAKAI; ENGELMANN, 2007) e, quando comparada com outras técnicas convencionais de criopreservação, tem demonstrado maiores taxas de sobrevivência. Para a bananeira, o aumento ficou em torno de 23 a 46%, dentre oito diferentes grupos genômicos (PANIS, PIETTE; SWENNEN, 2005). Sant et al. (2008) verificaram taxas de 73-100% de regeneração para acessos de taro, sendo significativamente superior aos 30% obtidos pelo protocolo básico de

vitrificação. Chen et al. (2011) também descreveram que o método de *droplet* foi eficiente para a conservação de cultivares de *Lilium*.

Para a cana-de-açúcar apenas um relato na literatura foi encontrado para a criopreservação de ápices por meio desse método (BARRACO; SYLVESTREA; ENGELMANN, 2011). Entretanto, de acordo com esses autores estudos adicionais necessitam ser realizados a fim de otimizar o protocolo para a espécie e aumentar a taxa de regeneração encontrada, de apenas 28%. Além disso, não existem trabalhos de criopreservação envolvendo as diversas variedades brasileiras de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- ALLEM, A. C. The terms genetic resource, biological resource, and biodiversity examined. **The Environmentalist**, v. 20, n. 4, p. 335-341, 2000.
- ALVAREZ, R. et al. Melhoramento da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 42, n. 3, p. 27-36, 1983.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, Sept. 2011.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. van. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation: an international journal on plant growth and development**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 147-173, Mar. 2011.
- BARRACO, G.; SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 320-324, Aug. 2011.
- BASNAYAKE, S. W. V.; MOYLE, R.; BIRCH, R. G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 439-448, Mar. 2011.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396-398, May 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Conservação *in situ*, *ex situ* e *on farm***. Disponível em: < <http://www.meioambiente.gov.br>>. Acesso em: 10 out. 2012.

BRITO, G. et al. Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. **Trees**, v. 24, n. 4, p. 723–732, Aug. 2010.

CANÇADO, G. M. de A. et al. Biotecnologia na cultura da videira. In: CANÇADO, G. M. de A.; LONDE, L. N. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agropecuária**. Caldas: EPAMIG Sul de Minas. Laboratório de Biotecnologia Vegetal, 2012. p. 613-644.

CARNEIRO, C. S.; CAL-VIDAL, J. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo solutos diversos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 423-432, fev. 2000.

CARVALHO, F. de. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 814-820, maio/jun. 2007.

CASU, R. E. et al. Genomics approaches for the identification of genes determining important traits in sugarcane. **Field Crops Research**, v. 92, n. 2-3, p. 137-147, June 2005.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 2, p. 397-403, Apr. 2011.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12, p. 3541-3549, Dec. 2011.

CHENGALRAYAN, K.; ABOUZID, A.; GALLO-MEAGHER, M. *In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 41, n. 4, p. 477-482, July/Aug. 2005.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa, 2010. p. 51-66.

CIDADE, D. A. et al. *In vitro* morphogenesis of Brazilian sugarcane varieties. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, mar. 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, Safra 2012/2013.** Brasília: Conab, 2012. 18 p.

DILLON, S. L. et al. Domestication to crop improvement: genetic resources for *Sorghum* and *Saccharum* (Andropogoneae). **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 5, p. 975-989, Oct. 2007.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

D'HONT, A. et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 250, p. 405-413, 1996.

EECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J. van. Exploitation of flow cytometry for plant breeding. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 4B, p. 743-750, 2005.

ELDESSOKY, D. S. Establishment of regeneration and transformation system of sugarcane cultivar GT54-9 (C9). **GM Crops**, v. 2, n. 2, p. 126-134, 2011.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Plant genetic resources: their conservation in situ for human use**. Rome, 1989.

FRANKLIN, G. et al. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum spp.* hybrids) midrib segment explants. **Plant Growth Regulation: an international journal on plant growth and development**, Dordrecht, v. 50, n. 2-3, p. 111-119, Nov. 2006.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GARCIA, R. et al. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type of growth regulator. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 90, n. 2, p. 181-190, Aug. 2007.

GIL, R.; MALHORTA, P. K.; GOSAL, S. S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 84, n. 2, p. 227-231, 2006.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; CLAVERO-RAMÍREZ, I.; LÓPEZ-ARANDA, J. M. Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 3, p. 341-351, 2004.

GUZMÁN-GARCÍA, E.; BRADAI, F.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Cryopreservation of avocado embryogenic cultures using the droplet-vitrification method. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 1, p.183–193, 2013.

HALMAGYI, A.; PINKER, I. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 84, n. 2, p. 145-153, Feb. 2006.

HELLER-USZYNSKA, K. et al. Diversity arrays technology effectively reveals DNA polymorphism in a large and complex genome of sugarcane. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 28, n. 1, p. 37-55, June 2011.

HO, W. J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, New York, v. 118, n. 3, p. 169-180, 1983.

HUANG, H. et al. Variations in leaf morphology and DNA methylation following *in vitro* culture of *Malus xiaojinensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 111, n. 2, p. 153-161, Nov. 2012.

KAEPPLER, S. M.; KAEPPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, n. 2-3, p. 179-188, June 2000.

KEATMETHA, W. et al. *In vitro* germplasm conservation of *Garcinia mangostana* L. and *Lansium domesticum* Corr. **Walailak Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 33-50, 2006.

LAKSHMANAN, P. et al. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum spp.* interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, Oct. 2006.

LAKSHMANAN, P. et al. Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Columbia, v. 41, n. 4, p. 345-363, July/Aug. 2005.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane - an addendum to the invited review 'Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities'. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Columbia, v. 42, n. 3, p. 201-205, May/June 2006.

LANGUIS, R. et al. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. ***Cryo-Letters***, Cambridge, v. 10, n. 1, p. 421-428, 1989.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell-cultures for plant improvement. ***Theoretical and Applied Genetics***, Berlin, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.

LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. In: CID, L. P. B (Ed.). ***Cultivo in vitro de plantas***. Brasília: Embrapa, 2010. p. 103-127.

LEMOS, E. E. P. et al. *In vitro* conservation of sugarcane germplasm. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, Oct. 2002.

LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. ***Ciência Rural***, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, 2011.

LINGLE, S. E. et al. Recurrent selection for sucrose content has altered growth and sugar accumulation in sugarcane. ***Field Crops Research***, Amsterdam, v. 113, n. 3, p. 306-311, Sept. 2009.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. An introduction to plant cell culture protocols: back to the future. In: _____. ***Plant cell culture - methods in molecular biology***. 2nd ed. New Jersey: Humana, 2006. 411 p.

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Columbia, v. 45, n. 3, p. 372-381, June 2009.

McCORMICK, A. J.; WATT, D. A.; CRAMER, M. D. Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. ***Journal of Experimental Botany***, Oxford, v. 60, n. 2, p. 357-364, Feb. 2009.

MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells *cultured in vitro*: somaclonal variation and beyond. ***Journal of Experimental Botany***, Oxford, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, July 2011.

MORDOCCO, A. M.; BRUMBLEY, J. A.; LAKSHMANAN, P. Development of a temporary immersion system (RITAA^(R)) for mass production of sugarcane (*Saccharum spp.* interspecific hybrids). ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Columbia, v. 45, n. 4, p. 450-457, Aug. 2009.

NIEVES, N. et al. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Columbia, v. 39, n. 3, p. 343-345, May 2003.

NIEVES, N. et al. Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum sp.*) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. ***Plant Cell Tissue and Organ Culture***: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 95, n. 3, p. 313-320, Dec. 2008.

OCHATT, S. J.; CONREUX, C.; JACAS, L. Flow cytometry distinction between species and between landraces within *Lathyrus* species and assessment of true-to-typeness of *in vitro* regenerants. ***Plant Systematics and Evolution***, v. 299, n. 1, p. 75-85, Jan. 2013.

OCHATT, S. J. Flow cytometry in plant breeding. ***Cytometry Part A***, v. 73, n. 7, p. 581-598, Apr. 2008.

OLIVEIRA, R. P. et al. *In vitro* conservation of diploid banana accessions. ***Scientia Agricola***, v. 57, n. 2, p. 245-249, abr./jun. 2000.

PANIS, B. et al. Droplet vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues?. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 908, p. 157-162, 2011.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: INTERNATIOL WORKSHOP ON THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY, 2005, Turin. **Anais...** Turin: Villa Gualino, 2005. p. 43-54.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

PEDROSO, A. N. V. et al. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 407-414, 2010.

PENCE, V. C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 176-187, Feb. 2011.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 284, n. 1, p. 65-73, July 2010.

POSSIEL, W. J.; SAUNIER, R. E.; MEGANCK, R. A. *In situ* conservation of biodiversity. In: SAUNIER, R. E.; MEGANCK, R. A. **Conservation of biodiversity and the new regional planning**. [S. l.]: Organization of American States and the IUCN/The World Conservation Union. 1995. 150 p.

PRADO, M. J. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 103, n. 1, p. 49-59, Oct. 2010.

RAJESWARI, S. et al. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and evaluation for quantitative and quality traits. **Euphytica**, Wageningen, v. 168, n. 1, p. 71-80, July 2009.

ROACH, B. T. Case for a core collection of sugarcane germplasm. **Proceedings of International Society of Sugarcane Technology**, v. 21, p. 339-350, 1995.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación in vitro del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 697-712.

ROCHA, D. I. et al. Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 111, n. 1, p. 69-78, Oct. 2012.

RYNÄNEN, L.; ARONEN, T. Vitrification, a complementary cryopreservation method for *Betula pendula* Roth. **Cryobiology**, San Diego, v. 51, p. 208–219, 2005.

SAINZ, M. B. Commercial cellulosic ethanol: The role of plant-expressed enzymes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 45, n. 3, p. 314-329, June 2009.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryoletters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, May/June 2007.

SANT, R. et al. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 107-111, Jan. 2008.

SANTOS, E.; BETTENCOURT, E. **Manual de apoio à formação e treino em conservação ex situ de recursos fitogenéticos**. Lisboa: Instituto Nacional de Investigação Agrária. 2002. 207 p.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, p. 60-65, maio/jun. 2001.

SARASAN, V. et al. Conservation *in vitro* of threatened plants - progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 42, n. 3, p. 206-214, May/June 2006.

SHAPIRO, H. M. The evolution of cytometers. **Cytometry**, v. 58A, n. 1, p. 13-20, Mar. 2004.

SILVA, T. L. da; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 4, p. 384-389, 2011.

SILVA, C. V. et al. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, n. 1, p. 407-416, Dec. 2011.

SMULDERS, M. J. M.; DE KLERK, G. J. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation: an international journal on plant growth and development**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 137-146, Mar. 2011.

SNYMAN, S. J. et al. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 2, p. 234-249, May 2011.

SNYMAN, S. J.; NKWANYANA, P. D.; WATT, M. P. Alleviation of hyperhydricity of sugarcane plantlets produced in RITA® vessels and genotypic and phenotypic characterization of acclimated plants. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 3, p. 685-692, Aug. 2011.

SUPRASANNA, P. et al. Profiling of culture-induced variation in sugarcane plants regenerated via direct and indirect somatic embryogenesis by using transposon- insertion polymorphism. **Sugar Technology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 26-30, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TAO, L.; ADEN, A. The economics of current and future biofuels. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Columbia, v. 45, n. 3, p. 199-217, June 2009.

URAGAMI, A. et al. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, n. 7, p. 418-421, Oct. 1989.

VEIGA, R. F. de A. et al. A criopreservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto Agronômico (IAC). **O Agrônomo**, Campinas, v. 58, n. 1/2, p. 19-21, Jan. 2006.

VOLK, G. M.; HARRIS, J. H.; ROTINDO, K.E. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution component. **Cryobiology**, San Diego, n. 52, p. 305-308, 2006.

VOLKS, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, San Diego, n. 52, p. 48-61, 2006.

WACLAWOVSKY, A. J. et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 263-276, Apr. 2010.

WANG, Y. L.; FAN, M. J.; LIAW, S. I. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, p. 29-34, 2005.

WITHERS, L. A; ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: ALTMAN, A. (Ed.). **Agricultural biotechnology**. New York: M. Dekker, 1997. p. 57-88.

WITHERS, L. A. *In vitro* conservation. **Biological Journal of the Linnecun Society**, v. 43, n. 1, p. 31-42, 1991.

ZUCCHI, M.I. et al. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 1, p. 91-96, 2002.

CAPÍTULO 2

**POTENCIAL ORGANOGÊNICO, TAXAS DE MULTIPLICAÇÃO E
ESTABILIDADE GENÔMICA POR CITOMETRIA DE
FLUXO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

RESUMO

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o potencial organogênico de vinte e duas variedades brasileiras de cana-de-açúcar, além de verificar a taxa de multiplicação *in vitro* e a estabilidade genômica por citometria de fluxo ao longo de subcultivos mensais e consecutivos. Para isso, ápices caulinares foram coletados em condições de campo e levados para o laboratório onde camadas externas de folhas foram retiradas. Após a assepsia, a porção aclorofilada foi seccionada e colocada em meio de MS suplementado com 5,0 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de KIN. Para a taxa de multiplicação, dez variedades foram selecionadas e inoculadas em meio de MS de consistência líquida ou semissólida acrescido de 0,10 mg L⁻¹ de KIN e 0,20 mg L⁻¹ de BAP. Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias por um período de até 8 meses. A estabilidade genômica foi verificada por citometria de fluxo a cada dois subcultivos. Ao final do experimento, as brotações foram enraizadas e aclimatizadas em casa de vegetação. Como resultados, observou-se regeneração tanto pela via organogênica direta como indireta. A variedade SP716949 apresentou a maior formação de brotos por explante (aproximadamente 14,5), seguida das variedades VAT 90-186 (11,7 brotos/explante) e VAT 90-212 (9,9 brotos/explante). Observou-se forte oxidação dos explantes em quatro das variedades estudadas o que, provavelmente, impediu a regeneração dos mesmos. Na multiplicação, observou-se interação significativa entre variedade, consistência do meio de cultura e número de subcultivos. De maneira geral, nos primeiros subcultivos o meio de consistência líquida apresentou resultados similares ou superiores quando comparado com o meio semissólido, contudo, a partir do quarto subcultivos, o meio semissólido foi superior. Variações morfológicas foram verificadas a partir do quarto subcultivo. Além disso, em algumas variedades, pequenas alterações na quantidade relativa de DNA foram detectadas por citometria de fluxo. Brotações de cana-de-açúcar de aspecto normal foram enraizadas e aclimatizadas com sucesso após o oitavo subcultivo.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Micropropagação. Variação somaclonal.

ABSTRACT

This study aimed to assess the organogenic potential of twenty-two varieties of Brazilian sugarcane, besides verifying the multiplication rate *in vitro* and genomic stability via flow cytometry during monthly and consecutive subcultures. For this, stem apices were collected in the field and taken to the laboratory where the outer leaf layers were removed. After sterilization, the achlorophyllated portion was sectioned and placed on MS medium supplemented with 5.0 mg L⁻¹ ANA and 0.5 mg L⁻¹ KIN. For the multiplication rate, ten varieties were selected and inoculated in liquid or semi-solid MS with added 0.10 mg L⁻¹ KIN and 0.20 mg L⁻¹ BAP. The subcultures were performed every 30 days over a period of 8 months, always keeping the number of tillers/flask constant. The genomic stability was verified by flow cytometry every two subcultures. At the end of the experiment, the shoots were rooted and acclimatized in a greenhouse. As results, we observed both direct and indirect organogenic regeneration. The variety SP 716949 was that which presented the highest shoot formation per explant (approximately 14.5), followed by varieties VAT 90-186 (11.7 shoots/explant) and VAT 90-212 (9.9 shoots/explant). We observed a strong oxidation of explants in four varieties studied that probably prevented regeneration. In the multiplication, we observed significant interaction among variety, culture medium consistency and number of subcultures. In general, in the first subcultures, the liquid medium provided similar or superior results when compared to the semi-solid, however, from the fourth subculture, the semi-solid was superior. Morphological variations were verified starting from the fourth subculture. Furthermore, in some varieties, small changes in the relative amounts of DNA were detected by flow cytometry. Sugarcane shoots of normal appearance were rooted and acclimatized after the eighth subculture.

Keywords: *Saccharum* spp. Micropropagation. Somaclonal variation.

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos de plantas têm sido efetivamente utilizadas para a propagação clonal e o melhoramento genético de diversas culturas (ROCHA et al., 2012), fornecendo não só plantas mais produtivas e resistentes a patógenos, mas também com maior vigor e adaptabilidade a diversos ambientes (PIPERIDIS; PIPERIDIS; D'HONT, 2010).

Entretanto, estes procedimentos exigem um sistema eficiente e previamente estabelecido para a seleção, regeneração e proliferação destas plantas de interesse agrônômico (YANG et al., 2010).

Para a cana-de-açúcar, desde que as abordagens relacionadas ao cultivo de células e tecidos iniciaram na década de 60, inúmeras técnicas foram desenvolvidas para o gênero. As vias organogênicas e embriogênicas se tornaram os sistemas de regeneração mais utilizados (LAKSHMANAN et al., 2006), apesar de competência e determinação dos explantes variar significativamente entre os genótipos (GARCIA et al., 2007; BASNAYAKE; MOYLE; BIRCH, 2011).

Atualmente, métodos biotecnológicos aplicados à propagação massal são uma realidade bastante comum na agroindústria de cana-de-açúcar por permitirem a produção de plantas com melhor qualidade e de maneira mais rápida que os métodos convencionais (SNYMAN et al., 2011). Contudo, a produção de plantas pode apresentar algumas limitações, como por exemplo, o estresse do ambiente *in vitro* que pode acarretar alterações epigenéticas (WANG; WANG, 2012).

De maneira geral, o método de cultivo aplicado e o número de subcultivos *in vitro*, assim como a concentração e tipo de reguladores de crescimento empregados, frequentemente, influenciam no surgimento de variações somaclonais em cana-de-açúcar (HUANG et al., 2012)

Estas variações podem ocorrer em nível morfológico, fisiológico, bioquímico e genético. Dentre estes, a variação morfológica é mais facilmente observada por meio de caracteres como estatura, morfologia foliar, diâmetro, pigmentação, entre outros (HUANG et al., 2012).

Pesquisas recentes têm demonstrado que a avaliação precoce da estabilidade genética das plantas regeneradas *in vitro* pode ser útil para provar a pureza dos regenerantes, especialmente durante a micropropagação clonal e nos estudos de transformação genética (SENGAR; SENGAR; GARG, 2011; PANDEY et al., 2012).

De fato, a ocorrência de variação somaclonal ainda continua a ser um dos grandes problemas da cultura de tecidos (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011), e para a cultura da cana-de-açúcar não é diferente.

Atualmente, dentre as várias técnicas disponíveis, especial atenção tem sido fornecida a citometria de fluxo para a detecção dos variantes somaclonais (MALLÓN; RODRÍGUEZ-OUBINA; LUZ GONZÁLEZ, 2010; PRADO et al., 2010).

Devido ao fato de as partículas serem analisadas individualmente e em alta velocidade, grandes populações de células podem ser mensuradas em um curto espaço de tempo (SHAPIRO, 2004). Por esta razão, a citometria tornou-se um excelente método para triagem de ploidia, detecção de mixoploidia e

aneuploidia e estimacão do contdo total de DNA (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

No Brasil, apesar da importância econmica da cana-de-açucar e do cultivo de mudas em grande escala via cultura de tecidos, nenhum grande estudo foi realizado até o momento para identificar as variedades brasileiras mais responsivas *in vitro* e, principalmente, verificar o comportamento e a estabilidade genômica destas em condies prolongadas de cultivo.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial organogênico e a taxa de multiplicaco *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açucar, bem como determinar a estabilidade genômica por citometria de fluxo dos regenerantes ao longo de oito subcultivos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Potencial organogênico de variedades brasileiras de cana-de-açúcar

Para verificar o potencial organogênico de plantas de cana-de-açúcar, ápices caulinares de 22 variedades brasileiras foram coletados na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo – AL e enviadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado em Brasília – DF (Tabela 1). A coleta foi realizada no mês de julho de 2012, aproximadamente 8 meses após o plantio no campo.

Tabela 1 Relação de variedades brasileiras de cana-de-açúcar enviadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para serem estabelecidas *in vitro*. Brasília – DF, 2011.

RB 83160	RB 92579	SP 791011
RB 99395	SP 813250	SP 701143
RB 863129	SP 851431	VAT 90-212
RB 867515	SP 716949	VAT 90-61
RB 93509	SP 813804	VAT 90-186
RB 845210	SP 854594	CB 98710
RB 921003	SP 784764	CB 45-3
RB 951541		

Em laboratório, os ápices caulinares foram lavados com detergente em água corrente e as camadas mais externas de folhas retiradas, a fim de facilitar o manuseio na câmara de fluxo laminar e evitar a contaminação dos explantes *in vitro*.

Após a realização da limpeza inicial, os ápices foram imersos em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaClO) (2,5% de cloro ativo) por vinte minutos, seguido de três lavagens em água destilada e autoclavada.

Com o auxílio de pinças e bisturi, cerca de 2 a 3 folhas foram retiradas e a porção mais interna e aclorofilada seccionada transversalmente, com espessura de aproximadamente 3 mm (Figura 1). Para evitar a oxidação, os explantes foram rapidamente inoculados em meio de cultura contendo sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,0 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 0,5 mg L⁻¹ de cinetina (KIN) e solidificado com 2,3 g L⁻¹ de *Phytigel*® (SIGMA), conforme protocolo estabelecido por Gill, Malhotra e Gosal (2006).

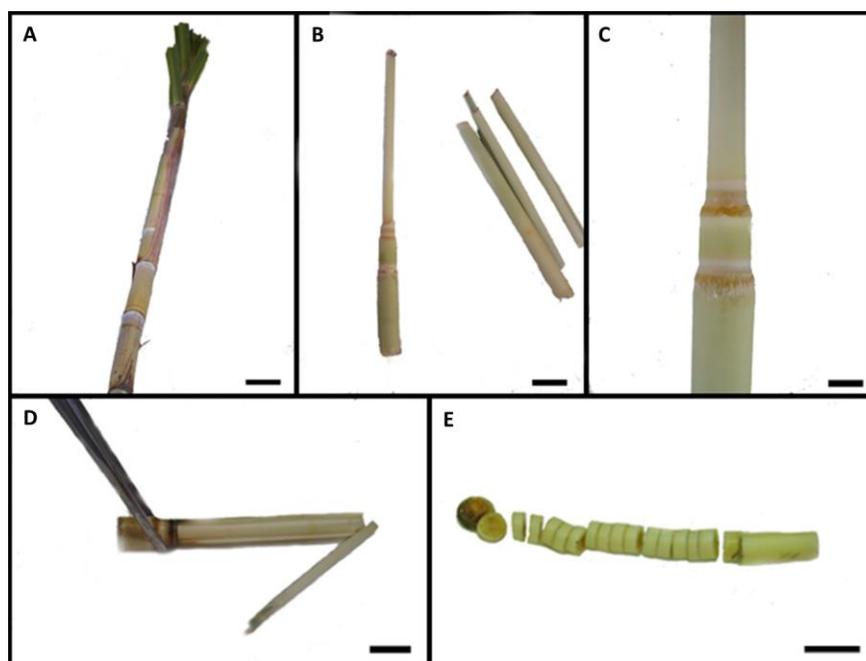


Figura 1 Procedimentos utilizados para indução da organogênese a partir de ápice caulinar de cana-de-açúcar provenientes de propágulos de plantas adultas do campo. Ápices caulinares antes da assepsia (A-C) (Barra = 5,0 cm) e após assepsia em câmara de fluxo laminar (D e E) (Barras = 1 cm).

Posteriormente à inoculação, os explantes foram mantidos na presença de luz, sob temperatura de 25 ± 2 °C, 16 horas de fotoperíodo e irradiação de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Sylvania, 40w) brancas frias.

Neste experimento, utilizaram-se 2 ápices caulinares para cada variedade de cana-de-açúcar, os quais foram seccionados fornecendo 30 explantes de 3 mm cada. Uma vez seccionados os explantes foram distribuídos

em delineamento inteiramente casualizado em 10 placas de *Petri* estéreis e descartáveis (15 x 90 mm), cada qual contendo 3 secções dos explantes.

Após 40 dias de cultivo avaliaram-se a percentagem de regeneração, o número médio de brotos regenerados, a percentagem de formação de raízes adventícias e calos na base dos explantes, bem como a percentagem de oxidação fenólica dos explantes.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico Sisvar® (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados expressos em percentagem foram transformados por arco-seno e os dados obtidos por contagem segundo $(x+1)^{0.5}$ com o intuito de atender os pressupostos necessários para a realização das análises.

2.1.1 Análise histológica

Para a análise anatômica e elucidação da rota de regeneração a partir de ápices caulinares *in vitro*, amostras foram coletadas aos 40 dias de subcultivo e fixadas em FAA 70 (Formaldeído, ácido acético e etanol 70%, em razão de 1:1:18 v/v) (JOHANSEN, 1940).

Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente (70-100%), infiltradas e incluídas em historresina (Leica®) de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes seriados transversais e longitudinais (7-10 μ m) foram obtidos em micrótomo rotatório manual (Leica modelo RM 2125), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida a 40°C.

Os cortes foram corados com azul de Toluidina (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964), seguido da montagem entre lâmina-lamínula com Entellan. Os resultados foram registrados em fotomicroscópio, acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Software ImagePro 4.0).

2.2 Taxa de multiplicação *in vitro*

Para avaliar a taxa de multiplicação e a estabilidade genômica das brotações ao longo de subcultivos consecutivos, dez variedades de cana-de-açúcar regeneradas, conforme item 2.1 e selecionadas aleatoriamente, foram utilizadas como fonte de explante para este experimento – SP 716949; SP 784764; SP 701143; SP 854594; RB 83160; RB 845210; RB 863129; VAT 90-212; VAT 90-186; VAT 90-61.

Para tanto, brotações foram excisadas da matriz em câmara de fluxo laminar, e inoculados em meio de MS adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,10 mg L⁻¹ de KIN e 0,20 mg L⁻¹ de BAP. Duas consistências do meio de cultura foram utilizadas: semissólida (MSS) e líquida estacionária (ML). A solidificação foi realizada com 2,3 g L⁻¹ de *Phytigel*. Para ambos os meios, o pH foi ajustado para 5,8±0,1 antes da esterilização, realizada por autoclavagem a 121° C por 20 minutos.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob condições de luminosidade, temperatura de 25±2 °C, 16 horas de fotoperíodo e irradiação de 30 µmol.m⁻².s⁻¹. As condições de cultivo foram as mesmas para todas as variedades.

Os subcultivos foram realizados em intervalos de 30 dias cada e, ao final de cada subcultivo, além da avaliação da taxa de multiplicação (número de brotos com tamanho superior a 0,5 cm), também foi determinado o diâmetro do caule com auxílio de um paquímetro digital, a altura dos brotos até a interseção da última folha, a formação de rosetas e anormalidades e a contaminação do meio de cultivo.

No total, foram realizados 8 subcultivos. Como repetição utilizaram-se 3 frascos de vidro de 250 mL de capacidade com 5 brotações para cada consistência de meio de cultivo (MSS e ML).

Os dados foram analisados em esquema de parcelas subdivididas no tempo pelo programa estatístico Sisvar e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados expressos em percentagem foram transformados por arco-seno e dados obtidos por contagem segundo $(x+1)^{0,5}$.

2.2.1 Estabilidade genômica por meio da citometria de fluxo

A cada dois subcultivos de 30 dias cada, brotações recém-formadas das dez variedades foram coletadas e avaliadas quanto ao conteúdo de DNA por citometria de fluxo no Laboratório de Cultura de Tecidos – Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Foram utilizadas aproximadamente 20-30 mg de folhas jovens das plantas, e do padrão de referência externo - tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.). Os tecidos foram triturados em placa de *Petri* contendo 1 mL de tampão de extração resfriado para a liberação dos núcleos (DOLEZEL; DOLEZELOVA; NOVAK, 1994). O tampão utilizado para estas análises foi o Marie (MARIE;

BROWN, 1993) [50 mM glicose, 15 mM NaCl, 15 mM KCl, 5 mM Na₂.EDTA, 50 mM citrato de sódio, 0.5% Tween 20, 50 mM HEPES (pH 7.2) e 1% (m/v) polivinilpirrolidona-10 (PVP-10)].

Após o processo de extração, a suspensão de núcleos foi aspirada com auxílio de pipeta de Pasteur e filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de uma solução de 1 mg/1mL de Iodeto de Propídeo.

O conteúdo de DNA nuclear em (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a fórmula:

$$\text{DNA amostra} = \left[\frac{\text{G1 amostra}}{\text{G1 padrão}} \right] \times \text{DNA padrão}$$

As análises foram realizadas em citômetro FacsCalibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA) e os histogramas gerados analisados estatisticamente no *software* WinMDI 2.8.

O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições por variedade, sendo que, cada uma foi composta por uma brotação e duas leituras. Os conteúdos de DNA (pg) obtidos foram submetidos a análises de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey no programa estatístico Sisvar.

2.2.2 Enraizamento *in vitro* e aclimatização em casa de vegetação

Ao final do oitavo subcultivo, brotações foram individualizadas, transferidas para meio de enraizamento e, uma vez enraizadas, aclimatizadas em casa de vegetação.

O meio de cultivo utilizado para a indução de raízes *in vitro* foi o de MS reduzido a 50%, acrescido de 5,0 mg L⁻¹ de ANA (PATHAK et al., 2009), 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,3 g L⁻¹ de *Phytigel*. O pH foi ajustado para 5,8±0,1 e 10 mL do meio de cultura distribuídos em tubos de ensaio (25 x 150 mm) antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos.

As brotações foram transferidas em câmara de fluxo laminar e as origens marcadas de acordo com o meio de multiplicação (ML ou MSS). Para cada variedade, as repetições foram compostas por 10 brotações oriundas do meio líquido e 10 brotações do meio semissólido. Após a inoculação, as brotações foram mantidas em sala de crescimento sob condições de luminosidade, temperatura de 25±2 °C, 16 horas de fotoperíodo e irradiação de 30 µmol.m⁻².s⁻¹.

A indução de raízes, a altura das brotações (cm) e a formação de brotos secundários foram avaliadas ao 40º dia de cultivo e, logo em seguida, iniciaram-se os processos de pré-aclimatização dos explantes ainda em sala de crescimento. Inicialmente, retirou-se o filme PVC utilizado para vedação dos tubos de ensaio e, 72 horas após, as tampas também foram removidas.

Transcorrido o período de 48 horas sem qualquer tipo de vedação, as brotações foram lavadas em água corrente, para remoção dos resíduos do meio de cultura, e levadas para casa de vegetação onde foram transplantadas em

bandejas de 60 células contendo substrato Bioplant® e areia, na proporção 1:1 (v/v).

Para proporcionar um microclima úmido para as brotações durante o período de aclimatização, estas foram envoltas por uma cobertura de plástico e irrigadas diariamente durante período de sete dias.

Após 21 dias de aclimatização, foram observados a percentagem de sobrevivência, o número de brotos e a altura da parte aérea (cm). Os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico Sisvar através de um esquema fatorial 2 x 10 (dois tipos de meios de cultura quanto à consistência x dez variedades). Dados referentes à percentagem foram transformados por arco-seno e dados de contagem segundo $(x+1)^{0.5}$. A comparação entre as médias foi feita pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Potencial organogênico das variedades de cana-de-açúcar e análise histológica

A regeneração da cana-de-açúcar *in vitro* a partir de segmentos de folhas imaturas ocorreu de forma rápida e eficiente e permitiu a obtenção de um grande número de brotos em curto espaço de tempo.

De acordo com Gill, Malhotra e Gosal (2006), o método de regeneração aplicado é simples e facilmente reproduzível para a indução de regeneração direta de plantas, a partir de segmentos de folhas imaturas. Entretanto, ao contrário dos resultados encontrados por esses autores, a regeneração das variedades brasileiras de cana-de-açúcar estudadas neste trabalho ocorreram tanto pela via organogênica direta (Figura 2A e B) quanto pela via indireta (Figura 2C) com formação de calos na base dos explantes antes da regeneração de novas brotações.

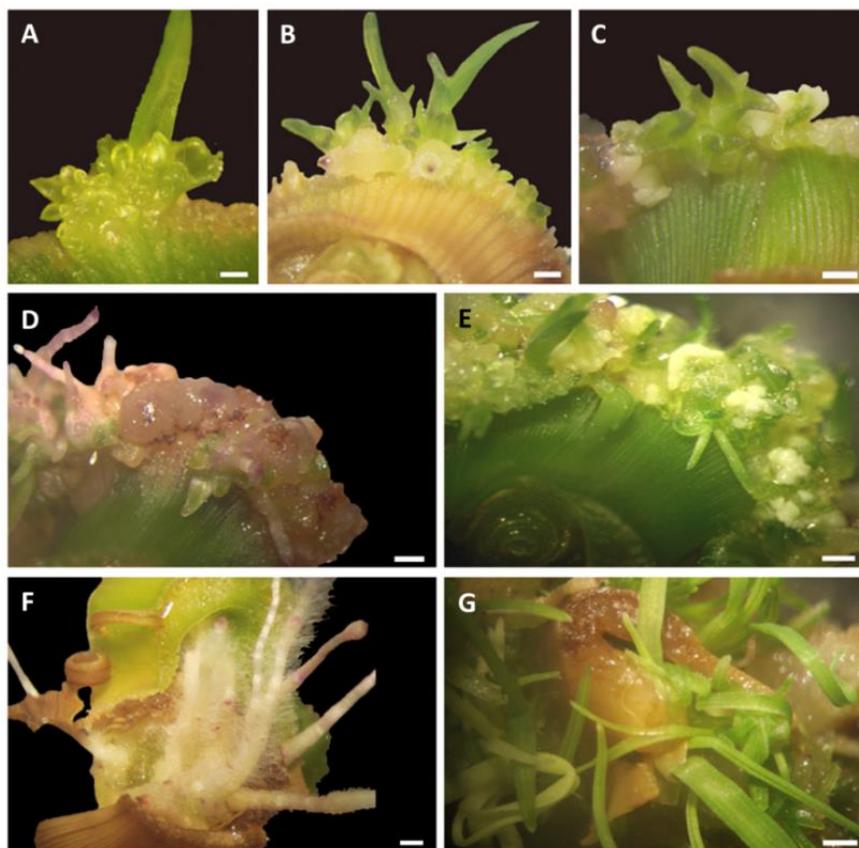


Figura 2 Organogênese *in vitro* de *Saccharum* spp. a partir de ápices caulinares de plantas de campo. A - B: Regeneração direta aos 30 dias de cultivo observados nas variedades SP 854594, RB 845210, respectivamente; C - E: Aspecto da regeneração indireta com formação de calos em secções dos explantes nas variedades SP 841431, RB 93509 e VAT 90-212; F: Formação de raízes adventícias na variedade RB 867515; G: Desenvolvimento dos brotos em meio de indução contendo ANA + KIN após 40 dias de cultivo (Barras = 0,5 cm).

Os calos formados inicialmente eram friáveis e apresentaram aspecto mucilaginoso (Figura 2D). Posteriormente, sobre este tecido, verificou-se o

surgimento de um calo compacto nodular de coloração esbranquiçada (Figura 2E). Em aproximadamente 15 dias de cultivo, observou-se a proliferação das massas calogênicas e o desenvolvimento de gemas adventícias, evidenciadas pela coloração verde.

De modo geral, o processo organogênico para todas as variedades estudadas neste trabalho ocorreu de forma assincrônica, com presença de gemas e brotos em diferentes estádios de desenvolvimento. Em alguns explantes, a formação de raízes adventícias foi observada (Figura 2F).

Na Figura 2G, pode-se verificar o desenvolvimento de brotações, aparentemente normais, a partir de segmentos foliares oriundos do campo.

A análise histológica confirmou o desenvolvimento de gemas adventícias contendo meristema apical e primórdios foliares formados diretamente do explante foliar. Observou-se o desenvolvimento do procâmbio conectando as gemas com o explante de origem (Figura 3A).

Gemas adventícias também se desenvolveram a partir de calos nodulares formados na base dos explantes de origem. Na figura 3B, é possível observar uma gema adventícia, em início de desenvolvimento, contendo meristema apical, primórdios foliares e tecidos procambiais. Estas características evidenciaram a estrutura unipolar das gemas, com ampla conexão com o calo organogênico.

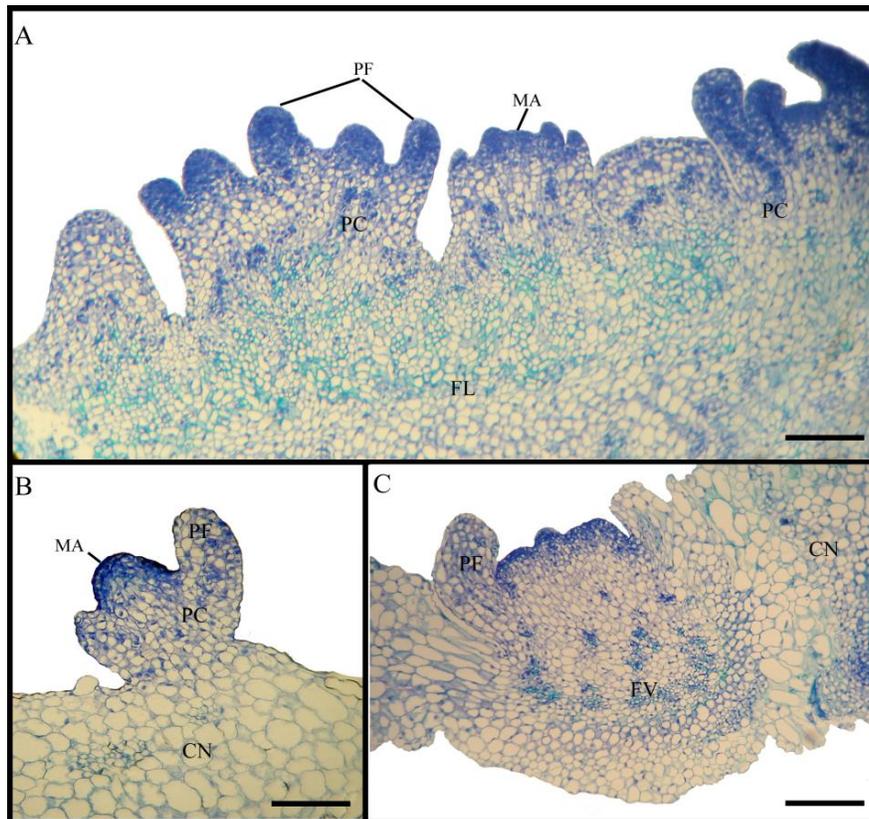


Figura 3 Análise histológica do processo organogênico de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). A: Gemas adventícias, em diferentes estádios de desenvolvimento, formadas diretamente do explante foliar; B: Desenvolvimento inicial de gema adventícia formada a partir de calo nodular; C: Gema adventícia, oriunda de calo nodular, em estágio mais avançado de desenvolvimento, apresentando primórdios foliares e feixes vasculares. MA: meristema apical do caule; PF: primórdios foliares; PC: procâmbio; FL: folha de origem; CN: calo nodular; FV: feixes vasculares (Barras = 50 μ m).

Em estágio mais avançado, gemas adventícias contendo feixes vasculares já desenvolvidos foram observadas conforme apresentado na Figura 3C.

Dibax et al. (2013) verificaram a regeneração dos brotos de duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e RB93509) a partir de dois tipos distintos de organização celular: calos nodulares similares a embriões somáticos em estágio globular ou calos organogênicos translúcidos com intensa divisão celular.

Garcia et al. (2007) verificaram que plantas *in vitro* de cana-de-açúcar quando incubadas na luz e na presença de alta concentração de auxina exibiram, primeiramente, regeneração direta a partir da camada externa do parênquima fundamental, seguido do desenvolvimento de calos organogênicos.

A percentagem de calos formados na base dos explantes para cada variedade estudada pode ser verificada na Tabela 2. Além disso, características como percentagem de formação de raízes adventícias e percentagem de oxidação fenólica também foram avaliadas, pois de alguma maneira, podem estar relacionadas com o potencial regenerativo das variedades estudadas, que neste trabalho, foi altamente influenciado pelo genótipo.

Tabela 2 Percentagem de explantes das variedades de cana-de-açúcar que apresentaram oxidação fenólica, formação de raízes adventícias e calo na base durante o cultivo em meio de cultura de MS + 5,0 mg L⁻¹ ANA e 0,5 mg L⁻¹ de KIN. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 2011.

Variedades	Calo	Raízes	Oxidação
RB 867515	4,1 c	37,2 a	20,6 c
RB 951541	4,1 c	4,7 b	62,0 a
RB 93509	0,0 c	4,6 b	61,5 a
RB 92579	14,0 c	4,7 b	66,5 a
CB 98710	22,1 c	3,6 b	29,5 b
SP 813804	16,5 c	6,6 b	56,4 a
SP 701143	45,6 b	16,5 b	41,2 b
SP 791011	8,2 c	24,7 b	41,2 b
RB 921003	44,3 b	44,0 a	22,0 c
SP 813250	59,6 b	6,6 b	6,6 c
RB 83160	28,4 c	23,5 b	37,8 b
CB 45-3	49,8 b	38,5 a	44,0 b
RB 863129	59,7 b	23,2 b	16,5 c
SP 841431	33,0 c	46,4 a	6,6 c
VAT 90-61	29,4 c	18,3 b	7,3 c
SP 784764	46,4 b	13,2 b	13,2 c
SP 854594	79,9 a	39,7 a	9,9 c
RB 845210	83,3 a	50,0 a	8,2 c
VAT 90-186	66,5 ^a	38,8 a	11,0 c
VAT 90-212	73,2 a	36,4 a	6,6 c
SP 716949	76,6 a	63,3 a	9,9 c
RB 99395	29,6 c	20,6 b	12,3 c

* Médias seguidas por mesma letra, pertencem ao mesmo grupo, pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A identificação dos genótipos com melhor capacidade morfogênica é o primeiro passo para estudos de transformação de plantas utilizando as técnicas de cultura de tecidos (TEXEIRA et al., 2011).

Como se pode verificar na Figura 4A, dentre as vinte e duas variedades estudadas, sete delas (SP784764, SP854594, RB845210, VAT90-186, VAT90-212, SP716949 e RB99395) se mostraram mais responsivas ao tratamento empregado ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN) em comparação às outras estudadas e apresentaram média de regeneração de pelo menos 81,9%.

Um grupo de nove variedades apresentou uma taxa de regeneração considerada intermediária, onde aproximadamente 60% dos explantes produziram brotos. Já as variedades com menor frequência de regeneração foram: SP 813804 (16%), RB 93509 (14,1%), RB 92579 (14,1%), CB 98710 (14,6%), RB 951541 (12%) e a variedade RB 867515, a qual apenas 4,11% dos explantes foram organogênicos (Figura 4A).

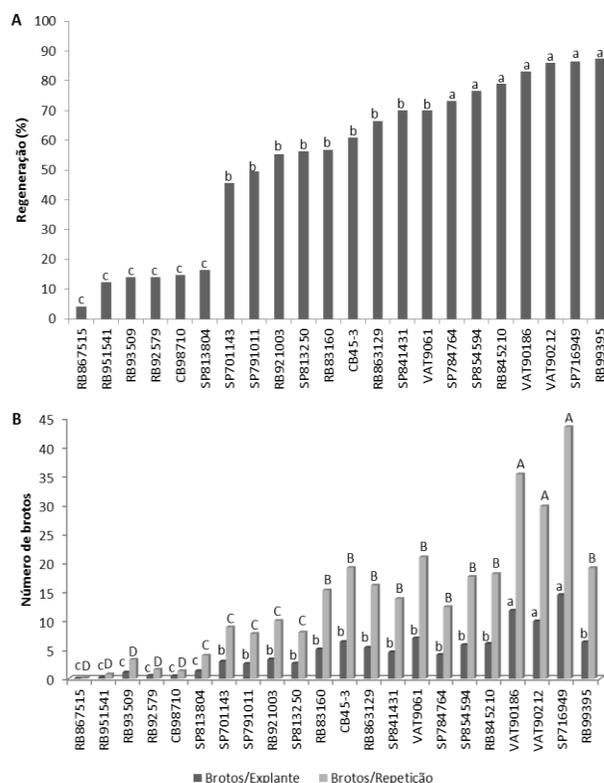


Figura 4 Comparação de variedades brasileiras de cana-de-açúcar quanto a percentagem de regeneração (A) e formação média de brotos (B), após 40 dias de cultivo em meio de cultura de MS suplementado com $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN. As variedades com a mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Lakshmanan et al. (2006) acreditam que apesar dos genótipos desempenharem um papel importante no controle da regeneração de brotos *in vitro*, este efeito pode ser minimizado com a concentração e tipo da auxina utilizada, a polaridade e a orientação do tecido, além do tamanho e do estágio de

desenvolvimento dos explantes. Neste sentido, torna-se evidente a necessidade de adaptar o protocolo utilizado para as variedades menos responsivas.

Dibax et al. (2013) obtiveram uma maior eficiência de regeneração das variedades RB 92579 (91%) e RB 93509 (60%) se comparado com os resultados encontrados neste trabalho, quando a cultura dos explantes ocorreu em um meio de indução de calo contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), seguido do cultivo em meio indutor de brotações, contendo $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ BAP.

Para a formação inicial de brotos, a transferência para meio contendo citocinina parece fundamental, uma vez que os genes ativados nesta fase respondem a indução por esta classe de fito-hormônio (CHE et al., 2006; FRANKLIN et al., 2006). Portanto, a regulação hormonal e o período de exposição à auxina/citocinina tornam-se importantes pontos a serem considerados para moderação da via de regeneração da cana-de-açúcar.

Além da variação na porcentagem de regeneração, observou-se que as variedades também se diferenciaram significativamente com relação à quantidade de brotos adventícios formados, ou seja, a alta frequência de regeneração da maioria das variedades, não está diretamente relacionada com o número médio de brotos formados.

Com resultados significativamente superiores, destacaram-se as variedades VAT 90-186, VAT 90-212 e SP 716949 com formação média de 35,3, 29,8 e 43,5 brotos por explante, respectivamente (Figura 4B).

Um segundo grupo, composto de nove variedades, apresentou formação média de 17,0 brotos por parcela e aproximadamente 5,6 brotos por explantes. Em seguida, aparece um terceiro grupo contendo cinco variedades e média de

7,7 brotos e, por último, cinco variedades de cana-de-açúcar apresentando média de apenas 1,4 brotos por explante (Figura 4B).

As variedades mais responsivas à regeneração (SP 854594, RB 845210, VAT 90-186, VAT 90-212 e SP 716949) foram as que apresentaram maior percentagem de explantes com formação de calos na superfície do corte e de raízes adventícias, contudo, menor percentagem de oxidação (Tabela 2).

Ao contrário, as variedades com menor percentual de regeneração (RB 951541; RB 93509; RB 92579 e SP 813804) foram as que apresentaram maior taxa de oxidação fenólica dos explantes, que comprometeram a regeneração dos mesmos.

Para algumas espécies de plantas, o corte do explante com o bisturi desencadeia a oxidação fenólica. Além disso, trabalhos relacionados constataram que os níveis de fenóis totais produzidos pelos tecidos aumentam ao longo do cultivo e a alta atividade da enzima polifenol oxidases (PPO) é que conduz ao escurecimento e, eventualmente, a morte do tecido (OZYIGIT, 2008).

Para evitar esse problema de produção de fenóis por parte dos tecidos, pesquisadores têm utilizado soluções antioxidantes como ácido cítrico, ácido ascórbico e cisteína antes da inoculação (KHAN et al., 2007; DIBAX et al., 2013) ou incluídos no meio de cultura (KHAN; KHATRI, 2006; LAKSHMANAN et al., 2006).

De maneira geral, a partir da data do corte do material vegetal e a execução dos trabalhos em laboratório, pode-se observar que os ápices caulinares permaneceram viáveis ao estabelecimento *in vitro* por aproximadamente uma semana e que, quando inoculados rapidamente em meio

de cultura, a regeneração ocorreu em aproximadamente quarenta dias de cultivo para a maioria das variedades.

3.2 Taxa de multiplicação em meio líquido e semissólido

De acordo com a análise estatística, os resultados encontrados para as variáveis analisadas, como número médio de brotos e altura da maior brotação, apresentaram interação significativa entre variedade, consistência do meio de cultura e número de subcultivos.

Conforme a Tabela 3 pode-se observar que as variedades apresentaram comportamentos distintos com relação ao potencial de multiplicação de brotos dentro e entre os meios de cultura utilizados (ML e MSS). De maneira geral, observou-se que nos primeiros subcultivos o meio de consistência líquida apresentou resultados similares ou superiores quando comparado com o meio de consistência semissólido. Entretanto, a partir do quarto subcultivo o MSS foi o que apresentou as maiores taxa de multiplicação para todas as variedades analisadas.

Contudo, os valores observados para ambas as consistências do meio de cultura de multiplicação não apresentaram um padrão de aumento ou redução no número médio de brotos ao longo dos subcultivos (Tabela 3).

Tabela 3 Taxa de multiplicação avaliada por meio do número de brotos/explante de variedades brasileiras de cana-de-açúcar a partir de perfilhos isolados e inoculados em meio de cultura de consistência líquida (ML) e semissólida (MSS). Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 2012.

Variedades	Subc 1		Subc 2		Subc 3		Subc 4	
	ML	MSS	ML	MSS	ML	MSS	ML	MSS
RB 83160	2,1 bA	1,5 bA	4,1 aA	3,5 cA	4,6 aA	3,3 bA	4,3 bB	6,9 bA
RB 863129	2,8 bA	1,7 bA	2,3 bA	2,3 cA	1,7 bA	1,5 bA	1,3 cB	4,1 cA
SP 784764	3,0 bA	2,1 bA	2,7 bA	2,7 cA	2,9 bA	2,9 bA	2,2 cB	5,5 cA
VAT90186	3,7 aA	2,7 bA	4,7 aA	3,2 cA	3,9 aA	1,4 bB	1,0 cB	4,8 cA
RB 845210	3,7 aA	1,5 bB	5,0 aA	4,9 bA	3,9 aA	3,7 bA	4,5 bB	8,5 aA
VAT 90-61	4,0 aA	2,0 bB	2,9 bA	3,0 cA	3,3 bA	2,4 bA	2,7 cB	5,7 cA
SP 701143	4,4 aA	4,4 aA	3,8 aB	6,5 aA	5,1 aA	6,4 aA	7,5 aB	9,5 aA
VAT90212	4,5 aA	2,1 bB	3,5 bA	3,7 cA	2,6 bA	2,1 bA	1,9 cB	5,7 cA
SP 716949	4,6 aA	2,2 bB	4,3 aA	3,7 cA	4,5 aA	2,9 bA	4,7 bB	6,9 bA
SP 854594	4,6 aA	2,9 bB	5,0 aA	4,3 cA	5,5 aA	2,7 bB	2,4 cB	5,0 cA

Tabela 3, continua

Variedades	Subc 5		Subc 6		Subc 7		Subc 8	
	ML	MSS	ML	MSS	ML	MSS	ML	MSS
RB 83160	4,4 aB	9,0 aA	5,8 aB	7,9 bA	4,5 bB	8,1 bA	4,8 aB	10,7aA
RB 863129	1,0 bA	2,6 cA	2,5bA	3,9 dA	2,5 cB	4,4 dA	0,0 cB	2,7 dA
SP 784764	2,0 bB	5,5 bA	4,8 aA	6,1 cA	4,9bA	6,7 cA	2,5bA	4,2 dA
VAT90186	1,7 bB	6,3 bA	1,0 bB	7,1 cA	0,0 dB	9,5 bA	0,0 cB	5,6 cA
RB 845210	3,2 aB	7,5 aA	4,1 aB	9,3 bA	3,7 cB	9,5 bA	5,2 aB	9,8 bA
VAT 90-61	3,2 aB	6,3 bA	5,2 aA	5,8 cA	2,8 cB	6,5 cA	2,0 bB	6,7 cA
SP 701143	4,5 aB	8,1 aA	7,0 aB	10,6aA	7,8 aB	11,7aA	6,1 aB	11,0aA
VAT90212	1,4 bB	4,2 cA	2,5 bB	7,1 cA	4,6 aB	8,9 bA	4,1 aA	4,0 cA
SP 716949	4,0 aB	6,2 bA	3,9 aB	7,1 cA	4,9 bB	8,2 bA	5,3 aB	8,5 bA
SP 854594	3,7 aB	6,0 bA	4,2 aB	8,6 bA	3,0 cB	10,3aA	2,0 aB	7,2 cA

* Médias seguidas por mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo, pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas distintas dentro de cada subcultivo diferem entre si pelo Teste de F.

As touceiras formadas em meio líquido e em meio semissólido foram aparentemente similares, porém com brotações mais finas (1,8 mm de diâmetro) e mais eretas quando formadas em meio geleificado (MSS) (Figura 5). O diâmetro das brotações formadas em ML foi de aproximadamente 2,7 mm e não houve diferença significativa entre as dez variedades estudadas.

Esses resultados corroboram os de Biradar et al. (2009) que verificaram brotos com qualidades morfológicas distintas, quando multiplicados em meio semissólido. De acordo com esses autores, a associação do meio com a alta concentração de BAP contribuiu para a formação de brotos mais finos e menores.

Já Cidade et al. (2006) observaram plantas de cana-de-açúcar mais vigorosas e com maior diâmetro do caule quando cultivadas em meio líquido sob agitação. Baseado nos dados encontrados por Lorenzo et al. (2001), o peso fresco das plantas nesse tipo de cultivo aumenta ao longo do tempo e a percentagem de água nos tecidos permanece quase constante, aproximadamente 90%.

De modo geral, o meio líquido favorece a incorporação de nutrientes e reguladores de crescimento pelas plantas, devido a menor resistência física encontrada para a difusão dos mesmos (SCHERWINSKI-PEREIRA; FORTES, 2003) e ao maior contato da superfície vegetal com o meio nutritivo (CIDADE et al., 2006).

Um ponto importante observado neste trabalho foi que para todas as variedades de cana-de-açúcar o cultivo em meio líquido não proporcionou a formação de brotos com aparência vitrificada (hiper-hidricidade) durante todo o período do experimento.

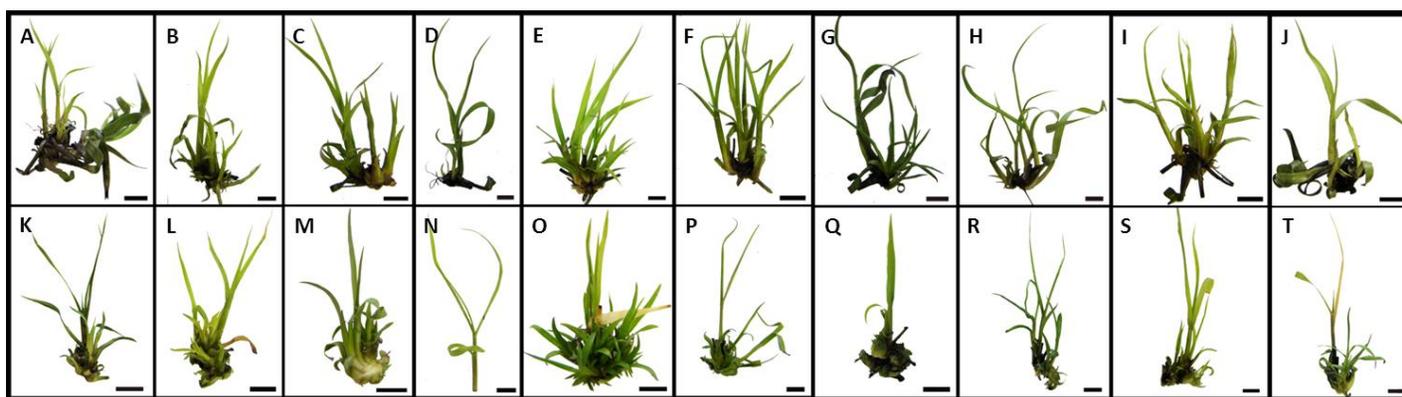


Figura 5 Aspecto visual das brotações de cana-de-açúcar no terceiro subcultivo quando multiplicadas em meio de cultura líquido (A-J) e semissólido (K-T). A e K: VAT 90-186; B e L: RB 845210; C e M: RB 83160; D e N: RB 863129; E e O: SP 701143; F e P: SP 716949; G e Q: SP 784764; H e R: SP 844594; I e S: VAT 90-61; J e T: VAT 90212 (Barras = 1 cm).

A variedade SP 701143 foi a que apresentou maior média de formação de brotos ao longo dos subcultivos em ambos os meios de cultura, quando comparado com as demais variedades. De acordo com a Figura 6, pode-se verificar um aumento significativo no número de brotos ao longo dos subcultivos, atingindo média de 11,2 brotos/perfilho em MSS e 6,9 brotos/perfilho em ML nos últimos três subcultivos.

Esta elevada taxa de multiplicação pode ser explicada pelo grande número de brotos formados na base de um perfilho principal, muitas vezes, de tamanho inferior a 1,0 cm de altura.

De maneira geral, este adensamento na região basal pode dificultar a individualização dos brotos e, conseqüentemente, impedir o processo de rizogênese dos mesmos. A altura média das maiores brotações foi de 3,0 cm para ML e 2,7 cm para MS.

As variedades RB 83160, RB 845210 e SP 716949 apresentaram comportamento semelhante na taxa de multiplicação, com aumento na produção de brotos no meio MSS, mas mantendo-se uma constância no ML ao longo do tempo de cultivo (Figura 6). A altura dos brotos no ML foi similar, com aproximadamente 3,4 cm para as três variedades, enquanto, que no MSS a altura dos brotos da variedade SP 716949 foi significativamente superior com 3,7 cm em relação às demais, com 2,8 cm de média. Observou-se que o aumento no número de brotações para a variedade RB 845210 ocorreu em detrimento do crescimento destas.

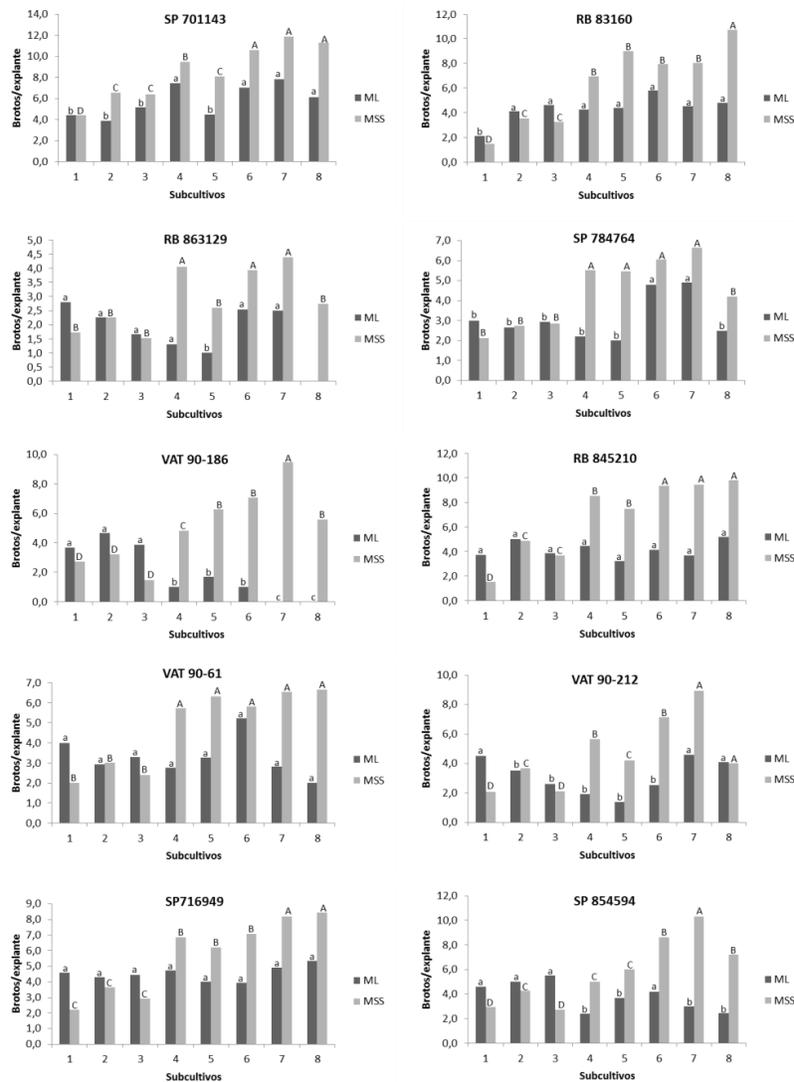


Figura 6 Taxas de multiplicação em meio líquido (ML) e semissólido (MSS) das dez variedades brasileiras de cana-de-açúcar em oito subcultivos consecutivos. * Letras minúsculas comparam a formação de brotos em ML e letras maiúsculas comparam no MSS indicando que médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

As variedades VAT 90-61, RB 863129 e SP 784764 não apresentaram produção de múltiplos brotos durante o experimento, mas observou-se um pequeno acréscimo a partir do quarto subcultivo em meio MSS (Figura 6). Quanto à altura dos brotos, estes apresentaram comportamentos distintos quando em MSS: a variedade SP 784764 foi a que apresentou a menor altura, com média de 2,6 cm, seguida da variedade RB 863129 com 3,0 cm e VAT 90-61 com altura significativamente superior, média de 3,7 cm. No meio líquido, estas variedades apresentaram altura mediana com aproximadamente 2,7 cm, quando comparadas com as demais.

As variedades VAT 90-212 e SP 854594 apresentaram boa taxa de multiplicação e, assim como as outras variedades, o MSS foi o que proporcionou os melhores resultados, após o quarto subcultivo (Figura 6). As alturas observadas foram de 2,2 cm e 2,6 cm em ML para VAT 90-212 e SP 854594, respectivamente, e de 2,8 cm em MSS para ambas as variedades.

Por fim, a variedade VAT 90-186 apresentou um acréscimo significativo na produção de brotos quando em meio MSS, porém, teve o potencial de multiplicação comprometido quando cultivadas em meio ML devido a forte oxidação fenólica, além de ter apresentado contaminação bacteriana.

De fato, o potencial de multiplicação da cana-de-açúcar é altamente influenciado pelo genótipo (CHEEMA; HUSSAIN, 2004; CIDADE et al., 2006; ALI et al., 2008; KHAN et al., 2008; VIEIRA et al., 2009). Contudo, os resultados podem ser otimizados por meio do ajuste da concentração e tipos de reguladores de crescimento utilizados para cada variedade (BIRADAR et al., 2009; KHAN et al., 2009).

Na maioria dos casos, a interação e o balanço hormonal entre as citocininas BAP e KIN tem demonstrado melhor eficiência no desenvolvimento de múltiplos brotos (KHAN et al., 2009; VIEIRA et al., 2009).

Ali et al. (2008) verificaram melhor multiplicação de brotos em meio contendo 0,25 mg L⁻¹ BAP e KIN ou quando o BAP foi utilizado isoladamente na concentração de 1,0 mg L⁻¹. Além disso, ao contrário dos resultados encontrados nesse trabalho, estes autores observaram que o meio ML aumentou a resposta dos brotos, enquanto o meio MSS retardou a multiplicação.

Dentre esses estudos, pode-se observar que o comprimento médio dos brotos foi dependente dos níveis de reguladores de crescimento utilizados nos meios de cultivo. Singh, Kumar e Garg (2006) relataram que algumas variedades de cana-de-açúcar preferem baixas concentrações de citocinina para um crescimento robusto, enquanto outras exigiram altas concentrações. Já Khan et al. (2008) verificaram um bom desenvolvimento adicionando giberelina (AG₃) no meio de multiplicação.

Não foi encontrado relatos na literatura contendo informações referentes ao potencial de multiplicação das variedades brasileiras de cana-de-açúcar estudadas neste trabalho.

Pode-se verificar na Tabela 4 qual seria o rendimento total de plantas no final do 4° e do 8° subcultivo para as dez variedades de cana-de-açúcar estudadas. Vale ressaltar que estes resultados foram baseados no desempenho das variedades *in vitro* ao longo de todos os subcultivos.

Tabela 4 Produção acumulada de plantas provenientes da multiplicação em meios de cultura de consistência líquida (ML) e semissólida (MSS) de dez variedades brasileiras de cana-de-açúcar, após o 4° e 8° subcultivos consecutivos. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 2012.

Variedades	4° subcultivo		8° subcultivo	
	ML	MSS	ML	MSS
SP 701143	3.250*	8.698	4.851.256	9.236.390
RB 83160	862	582	478.285	3.593.345
RB 845210	1.605	1.161	403.790	7.489.719
SP716949	2.086	809	861.825	2.457.232
SP 854594	1.526	852	173.149	3.269.357
VAT 90-212	401	454	26.842	1.215.359
VAT 90-61	532	266	50.523	50.523
VAT 90-186	329	306	0,0 **	716.696
SP 784764	257	460	30.246	425.591
RB 863129	68	121	0,0 **	14.905

*Valores relativos a uma parcela contendo inicialmente 5 perfilhos por subcultivo, ** Morte dos explantes.

A partir desses resultados é possível observar com maior clareza as variedades mais responsivas à multiplicação *in vitro* e o melhor sistema de cultivo empregado, líquido ou semissólido.

A superioridade do meio de cultura de consistência semissólida em relação à produção de múltiplos brotos pode ser explicada pelo início de contaminação bacteriana do meio líquido e pela variação morfológica das brotações formadas a partir do quarto subcultivo (disposição tipo roseta).

Apesar da facilidade de trabalho e da boa taxa de multiplicação, o meio de cultura com consistência líquida dificultou a visualização da contaminação bacteriana durante a execução do experimento. Neste sentido, observou-se uma progressão no número de repetições contaminadas (Figura 7), atingindo um pico

de aproximadamente 45% dos frascos contaminados no final do oitavo subcultivo.

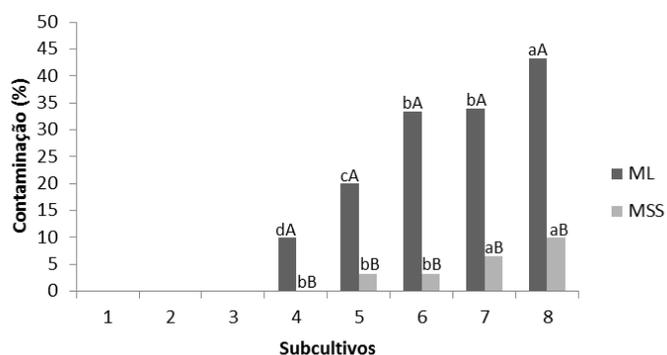


Figura 7 Percentagem de contaminação dos meios de consistência líquida (ML) e semissólida (MSS) durante o período do experimento de multiplicação *in vitro* da cana-de-açúcar. * Letras minúsculas comparam os subcultivos dentro de cada consistência do meio de cultura e letras maiúsculas comparam os meios de cultura quanto à consistência em cada subcultivo ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott. Letras iguais pertencem a um mesmo grupo.

Observou-se uma disseminação da contaminação entre frascos mesmo com a individualização de pinças e bisturis, esterilização a cada repetição e realização de repicagens em dias diferentes.

A contaminação do meio líquido proporcionou efeitos negativos na multiplicação da cana-de-açúcar, chegando a inibir completamente a multiplicação de algumas variedades (Tabela 3). A percentagem de contaminação no meio MSS foi significativamente inferior, com média de 10% ao final do experimento (Figura 7).

Variações morfológicas também foram verificadas ao longo dos subcultivos consecutivos. A partir da quarta repicagem, observou-se uma maior formação de brotos de tamanho reduzido ($< 1,5$ cm) na base de uma brotação principal de maior tamanho. Este tipo de disposição foi denominado neste experimento de roseta (Figura 8A-D).



Figura 8 Variações morfológicas observadas em diferentes variedades de cana-de-açúcar após subcultivos consecutivos em meio semissólido. Destaque para a disposição tipo roseta, com adensamento de brotos na região basal (A - D) e o aspecto de anormalidade (E) e formação de massas verdes (F-G). A: RB 845210 no quinto subcultivo; B: SP 716949 no sexto subcultivo; C: VAT 90-212 no sétimo subcultivo; D: SP 701143 no oitavo subcultivo; E: RB 863129 no quarto subcultivo; F e G: RB 845210 no sexto e sétimo subcultivos, respectivamente. (Barras = 1 cm).

A taxa de formação de rosetas foi significativamente superior quando os perfilhos foram cultivados em meio de cultura de consistência semissólida e, principalmente, foi altamente influenciada pelo genótipo.

Os níveis mais pronunciados de formação de rosetas foram observados nas variedades RB 845210 e SP 701143, com médias totais de 37 e 34%, respectivamente. Em seguida, o fenômeno foi mais observado na variedade SP 716949 com média de 19% de formação de rosetas no MSS. As demais variedades apresentaram este tipo de disposição em menor frequência, em taxas que variaram entre 0,8 a 10% durante os subcultivos, independentemente do meio de cultura utilizado (Figura 9).

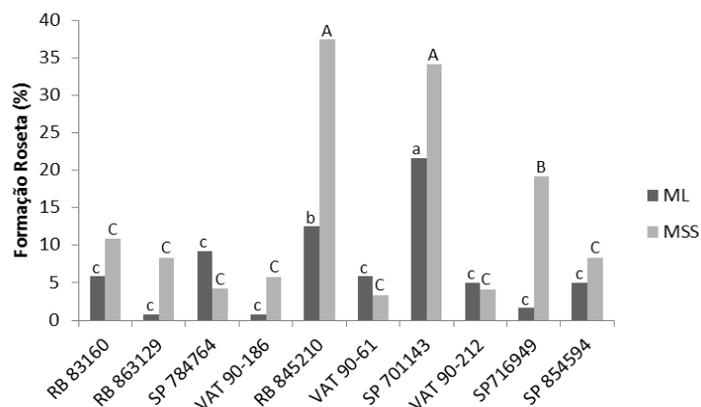


Figura 9 Percentagem de formação de rosetas nos meios de cultura de consistência líquida (ML) e semissólida (MSS) durante o experimento de multiplicação *in vitro* de dez variedades de cana-de-açúcar. * Letras minúsculas comparam ML e letras maiúsculas comparam MSS pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras iguais pertencem a um mesmo grupo.

A disposição dos brotos e as variações fenotípicas observadas no tempo apresentam implicações práticas quando se considera a produção em larga escala de mudas sadias e uniformes. Nestes casos, a individualização dos perfilhos e o processo de rizogênese podem ser comprometidos.

Geralmente este encurtamento é reversível quando os brotos são transferidos para meios básicos sem a presença de reguladores de crescimento, principalmente citocininas, anteriormente a fase de rizogênese (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; ANDRADE, 2011; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).

A adição de citocininas exógenas no meio de cultura, muitas vezes, é requerida para a diferenciação e formação de brotos adventícios. Porém, anormalidades morfológicas têm sido relatadas quando as plantas são cultivadas em sua presença. Ramage e Willians (2004) verificaram a formação de rosetas em plantas de tabaco cultivadas na presença de BAP. Brotos vitrificados (SIVANESAN; JEONG, 2012), variações anatômicas e ultra-estruturais (QUIALA et al., 2012), nanismo e ramificação excessiva (HONDA et al., 2011) também foram detectados como mudanças típicas causadas em resposta às citocininas.

As alterações observadas, em diferentes níveis, possivelmente tenham sido causadas pela toxidez devido à alta concentração de fito-hormônios no meio e/ou pelo período prolongado em que a cultura permanece exposta a eles (RAMAGE; WILLIAMS, 2004).

Neste trabalho, pode-se verificar, em alguns casos, a formação de brotações isoladas ou na base das touceiras com aspecto anormal, apresentando folhas oxidadas e/ou necrosadas (Figura 8E). Provavelmente, o excesso de

citocinina, decorrente de numerosos ciclos de multiplicação, pode ter acarretado tais variações.

Eventualmente, observou-se o surgimento de massas verdes caracterizadas pela formação excessiva de brotações de tamanho reduzido e aparentemente anormais, com folhas retorcidas, desorganizadas e de coloração verde clara (Figura 8F e G). Essas foram observadas durante a multiplicação da variedade RB 845210 a partir do quinto subcultivo.

Sabe-se que o cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar muitas vezes apresenta níveis consideráveis de variação somaclonal, principalmente quando os explantes são expostos à alta concentração de reguladores e/ou longos períodos de cultivo (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; ZUCCHI et al., 2002).

Taylor et al. (1995) encontraram variações morfológicas como perfilhamento abundante e dobramento do limbo foliar em plantas de cana-de-açúcar regeneradas de calos embriogênicos. Entretanto, poucas bandas polimórficas foram detectadas através da análise de RAPD, indicando que as variações genéticas foram pouco frequentes.

Entretanto, variações de caráter genético já foram reportadas anteriormente para a espécie e, de modo geral, devem ser levadas em consideração. Heinz e Mee (1971) trabalhando com plantas de cana-de-açúcar (variedade H50-7209) regeneradas a partir do cultivo de calos detectaram clones com variação no número de cromossomos 94 a 120.

Zucchi et al. (2002) estudando a instabilidade genética da variedade brasileira RB 83-5486 encontraram uma taxa de polimorfismo de aproximadamente 6% quando as plantas foram derivadas de meristemas.

Variações genéticas entre regenerantes de rotas morfogênicas distintas (direta e indireta) foram relatadas por Suprasanna et al. (2010). Além disso, diferenciação na resistência a doenças e pestes, tolerância a estresses e outras características agrônômicas de interesse também já foram induzidas a partir de plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* (SINGH et al., 2008; RAJESWARI et al., 2009).

De maneira geral, estes estudos têm demonstrado que alguns genótipos de cana-de-açúcar são mais propensos à variação que outros e que a instabilidade é possivelmente consequência da interação entre genótipo e meio de cultivo (ZUCCHI et al., 2002; SNYMAN et al., 2011). Este fato também é comprovado por meio dos resultados encontrados neste trabalho, onde as dez variedades brasileiras de cana-de-açúcar estudadas apresentaram níveis distintos de variação fenotípica, quando cultivados nas mesmas condições ambientais.

A origem das variações encontradas no ambiente *in vitro*, na maioria das vezes, é desconhecida. E embora as mutações na sequência do DNA tenham sido apontadas como causa provável de variação fenotípica, está se tornando cada vez mais claro o papel desempenhado pela regulação epigenética (MIGUEL; MARUM, 2011).

A regulação epigenética na variação somaclonal proposta por Bird (2007) envolve a adaptação estrutural de regiões cromossômicas a fim de registrar, sinalizar ou perpetuar os estados de atividade alterados. É um evento altamente dinâmico e está intimamente relacionado com as variações fenotípicas dos indivíduos (MIGUEL; MARUM, 2011).

A metilação do DNA é um dos mecanismos principais de alterações epigenéticas e, normalmente, está relacionada ao silenciamento de genes em

resposta ao ambiente na qual estão inseridos (MIGUEL; MARUM, 2011). Neste caso, ocorrem em resposta ao estresse induzidos pelas próprias condições do meio *in vitro* (meio, presença de duas citocininas e subcultivos consecutivos, etc).

Variações em diferentes níveis também têm sido encontradas para outras espécies da família *Poaceae*. Aberrações cromossômicas, variações na sequência de nucleotídeos do DNA (inserções e deleções), assim como variações morfológicas já foram detectadas em plantas de arroz (*Oryza* spp.) regeneradas *in vitro* (KHARABIAN; DARABI, 2005; RASHEED et al., 2005; MIYAO et al., 2012). Similarmente, variações em plantas de cevada também já foram relatadas (BEDNAREK et al., 2007).

Para o sorgo, alterações genéticas e epigenéticas por meio do nível de metilação do DNA foram detectadas por Zhang et al. (2009). Anteriormente, diferenças em caracteres qualitativos como filotaxia das folhas, ramificação e estrutura da nervura central foram reportadas por Maralappanavar, Kuruvinashetti e Harti (2000).

Alguns autores acreditam que a variação somaclonal é uma forma alternativa de criar variantes e assim expandir a variabilidade do germoplasma das espécies (LI; BRUNEAU; QU, 2010). Contudo, é indesejável na multiplicação clonal de mudas geneticamente uniformes para fim comercial.

Neste sentido, apesar da alta taxa de multiplicação *in vitro* das variedades de cana-de-açúcar, as variações morfológicas observadas a partir de determinado número de subcultivos pode inviabilizar o processo de obtenção de mudas e, claramente, demonstram a necessidade periódica de renovação do material a ser propagado.

De modo geral, a compreensão dos efeitos por trás das anormalidades que ocorrem na cultura de tecidos de plantas em presença de reguladores de crescimento é difícil devido à grande variedade de respostas que estes provocam no crescimento e desenvolvimento dos vegetais.

Atualmente, várias técnicas biotecnológicas têm sido aplicadas para a elucidação dos mecanismos envolvidos nas mais distintas variações induzidas *in vitro* (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011).

A alta precisão e rapidez das análises têm colocado a técnica de citometria de fluxo em evidência para a verificação da estabilidade genética das plantas regeneradas *in vitro* (SILVA et al., 2011). Por meio da intensidade de fluorescência, o conteúdo de DNA é estimado e comparado entre as plantas de interesse em um curto período de tempo (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

3.2.1 Estabilidade genômica por meio da citometria de fluxo

A cana-de-açúcar tem se mostrado uma excelente candidata para estudos de variação somaclonal, devido uma combinação de fatores como eficiência *in vitro*, variações morfológicas, complexidade genômica e importância econômica.

De maneira geral, a análise das brotações *in vitro* por citometria de fluxo resultou em um pico G1 de DNA com boa resolução e coeficientes de variação inferiores à 3,5%. Histogramas representativos de três variedades de cana-de-açúcar estão mostrados na Figura 10.

Para as 10 variedades estudadas, sete (RB 83160, VAT 90-186, VAT 90-212, SP 701143, SP 854594, RB 845210 e SP716949) não apresentaram

variações na quantidade relativa de DNA ao longo de oito subcultivos consecutivos. Contudo, para as variedades RB 863129, VAT 90-61 e SP 784764 diferenças estatísticas foram detectadas no conteúdo médio de DNA em resposta aos oito subcultivos consecutivos (Tabela 5).

As variedades RB 863129 e SP 784764 apresentaram redução de aproximadamente 0,4 a 0,5 pg na quantidade de DNA, a partir do quarto subcultivo. Ao contrário, a variedade VAT 90-61 exibiu uma tendência de aumento no conteúdo relativo de DNA ao longo do tempo de cultivo *in vitro*.

Além destes resultados, verificou-se que não houve diferenças estatísticas significativas entre as brotações multiplicadas nos meios de cultivo líquido ou semissólido.

As variações na quantidade relativa de DNA, mesmo que pequenas, ocorreram em 30% das variedades a partir do quarto subcultivo consecutivo e coincidiram com o surgimento de alterações morfológicas dos explantes. Estas duas características observadas evidenciam a necessidade de se controlar o número de subcultivos consecutivos para a cana-de-açúcar.

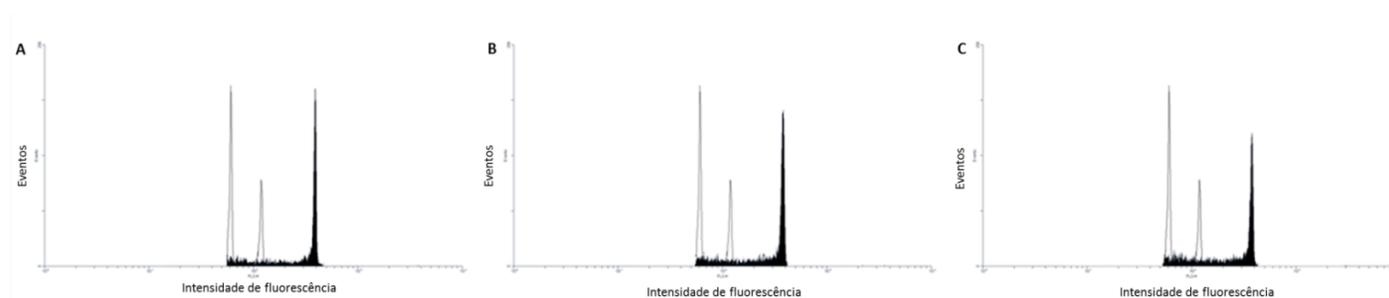


Figura 10 Histogramas relativos à análise por citometria de fluxo da quantidade de DNA de cana-de-açúcar obtidos usando o tampão Marie. O primeiro pico corresponde ao padrão tomateiro e o segundo pico corresponde à cana-de-açúcar. A: Variedade SP 716949; B: Variedade VAT 90-186; C: RB 863129.

Tabela 5 Conteúdo médio de DNA relativo (pg) das variedades de cana-de-açúcar verificados ao longo de subcultivos consecutivos. UFLA, Lavras-MG, 2013.

N° de Subcultivo	Variedade									
	RB83160	VAT90186	VAT90212	VAT90-61	SP701143	RB863129	SP854594	SP784764	RB845210	SP716949
2°	12,4904 a	12,3874 a	12,5700 a	12,3613 b	12,3511 a	12,2605 a	12,3848 a	12,6137 a	12,7171 a	12,7889 a
4°	12,4528 a	12,1324 a	12,6606 a	12,5385 ab	12,3980 a	12,3104 a	12,4279 a	12,6131 a	12,7029 a	12,9319 a
6°	12,6707 a	12,4170 a	12,4829 a	12,7256 ab	12,5341 a	11,8797 b	12,3752 a	12,4103 ab	12,7583 a	12,8185 a
8°	12,5127 a	12,4583 a	12,5730 a	12,7602 a	12,2788 a	11,7498 b	12,4327 a	12,2249 b	12,8551 a	12,9703 a

* Médias seguidas por mesma letra, pertencem ao mesmo grupo, pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O tamanho do genoma das plantas ou o conteúdo 2C de DNA nuclear é altamente plástico em resposta as condições do ambiente (MSOGOYA; GROUT; ROBERTS, 2011). De acordo com Bennetzen, Ma e Devos (2005), o aumento no tamanho do genoma pode ser causado por fenômenos como poliploidia e por elementos transponíveis (transposons). Ao contrário, a diminuição ocorre, frequentemente, por deleções ou quebras cromossômicas (PETROV, 2001).

In vitro, a condição de estresse causada pelas constantes repicagens, o uso de reguladores de crescimento e o cultivo por período prolongado pode ter supostamente proporcionado à ocorrência destes fenômenos, uma vez que, em duas variedades (RB 863129 e SP 784764) observou-se uma tendência de queda no conteúdo de DNA, enquanto para uma variedade (VAT 90-61) houve um pequeno aumento (Tabela 5).

Assim como neste trabalho, variações no conteúdo global de DNA em resposta ao cultivo *in vitro* também foram detectadas por citometria de fluxo para outras espécies vegetais. A combinação de 2,4-D com cinetina provocaram uma redução na quantidade relativa de DNA, correspondente à perda de 4 a 5 cromossomos, em algumas plantas de *Gossypium hirsutum* regeneradas por cultura de calos (JIN et al., 2008).

A micropropagação de banana acarretou na formação de somaclones com conteúdo de DNA das folhas significativamente menor (1,72 picogramas) quando comparados com plantas normais, com valor estimado de 1,82 picogramas. Ressalta-se que estas plantas foram detectadas em condição de campo por apresentarem variações morfológicas (MSOGOYA; GROUT; ROBERTS, 2011).

Porém, baseado em resultados encontrados por Loureiro et al. (2007), nem sempre variações morfológicas estão diretamente associadas com mudanças genéticas. Esses autores verificaram que plantas de *Juniperus phoenicea* micropropagadas *in vitro*, embora apresentassem morfotipos distintos, não diferiram na quantidade de DNA.

Até o momento, na literatura não foi encontrado relatos com tendência de um pequeno aumento do conteúdo de DNA em resposta ao ambiente *in vitro*, conforme observado neste trabalho para a variedade VAT 90-61.

Entretanto, aumentos significativos da quantidade de DNA foram verificados em plantas regeneradas *in vitro* e essa variação foi correspondente à ocorrência do fenômeno de euploidia (triploides, tetraploides e mixoploides) em plantas (CLARINDO et al., 2008).

Para esses estudos com citometria de fluxo, Dolezel, Greilhuber e Suda (2007) destacaram a importância dos coeficientes de variação para a detecção de anomalias, principalmente, aneuploidias.

Para Campos et al. (2009), os valores baixos do coeficiente de variação (CV) permitem alta confiabilidade nas estimativas de quantidade de DNA obtidas, o que leva à conclusão sobre a existência ou não de instabilidade genômica nas plantas *in vitro*. De acordo com Dolezel e Bartos (2005), CVs provenientes da citometria de fluxo abaixo de 5% são aceitáveis e confiáveis.

Brito et al. (2010) detectaram uma pequena diferença no conteúdo de DNA, mas estatisticamente significativa, entre plantas de *Olea* sp. aclimatizadas e as plantas *in vitro*. Contudo, apesar do CV estar dentro dos padrões confiáveis, estes autores atribuíram estas variações aos efeitos negativos causados por compostos citosólicos sobre a coloração do iodeto de propídeo. Todavia, a

possibilidade de ocorrência de anomalias cromossômicas não pode ser descartada.

Neste sentido, estudos mais aprofundados e análises citogenéticas complementares devem ser realizados para a comprovação de possíveis anomalias.

3.2.2 Enraizamento *in vitro* e aclimatização em casa de vegetação

O processo de enraizamento das brotações de cana-de-açúcar oriundas da multiplicação *in vitro* ocorreu de maneira eficiente em meio MS contendo metade de suas concentrações salinas e suplementado com 5,0 mg L⁻¹ de ANA (Tabela 6). Ressalta-se que as brotações tiveram suas origens (ML ou MSS) marcadas até o período de aclimatização em casa-de-vegetação.

Pode-se observar na Tabela 6, que as plantas oriundas do meio líquido apresentaram uma taxa de 90 a 100% de enraizamento, exceto a variedade RB 845210 que apresentou formação de raízes significativa inferior (60%). Quatro variedades não apresentaram quantidade suficiente de plantas para serem enraizadas e, em seguida, aclimatizadas. Foram elas: RB 863129, VAT 90-61, SP 8594 e VAT 90-186.

Tabela 6 Resposta das brotações de cana-de-açúcar multiplicadas em meio líquido (ML) e semissólido (MSS) ao processo de rizogênese *in vitro*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 2012.

Variedades	Enraizamento (%)		N° Raízes		N° Brotos	
	ML	MSS	ML	MSS	ML	MSS
RB 845210	60 bB	100 aA	27,0 bA	22,4 bA	3,9 aB	7,3 aA
SP 784764	90 aA	80 aA	36,0 bA	20,0 bB	3,7 aA	3,3 bA
SP 701143	90 aA	90 aA	45,0 aA	28,0 bB	3,6 aA	5,4 aA
RB 83160	100 aA	80 aA	54,0 aA	34,0 aB	3,2 aA	2,8 bA
VAT 90-212	100 aA	90 aA	25,8 bA	26,2 bA	3,8 aA	4,9 aA
SP 716949	100 aA	90 aA	41,0 aA	36,0 aA	2,5 aA	3,9 bA
RB 863129	-	100 aA	-	19,1 bA	-	2,7 bA
VAT 90-61	-	100 aA	-	41,0 aA	-	4,2 bA
SP 854594	-	100 aA	-	23,8 bA	-	6,0 aA
VAT 90-186	-	100 aA	-	41,0 aA	-	6,8 aA

* Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas distintas dentro de cada variável diferem entre si pelo Teste de F.

Com relação ao enraizamento das brotações oriundas do meio semissólido, pode-se observar que não houve diferença significativa entre as 10 variedades avaliadas. A proliferação de raízes *in vitro* ocorreu entre 80 e 100% das brotações (Tabela 6).

O número médio de raízes formadas foi elevado (acima de 20 por planta), contudo, diversificou entre as variedades e o seu meio de origem. A produção de novos brotos também foi observada durante o período de rizogênese *in vitro* (Tabela 6).

Diante desses resultados, pode-se verificar que a ramificação dos perfilhos não prejudicou o processo de enraizamento. Além disso, verificou-se

que a maior parte das raízes adventícias foi formada na base do broto principal, o de maior comprimento.

Durante os quarenta dias de cultivo em meio de enraizamento, foi possível constatar um aumento significativo na altura das brotações. A diferença entre altura inicial e final pode ser verificada na Figura 11 para ambas as origens marcadas (ML e MSS).

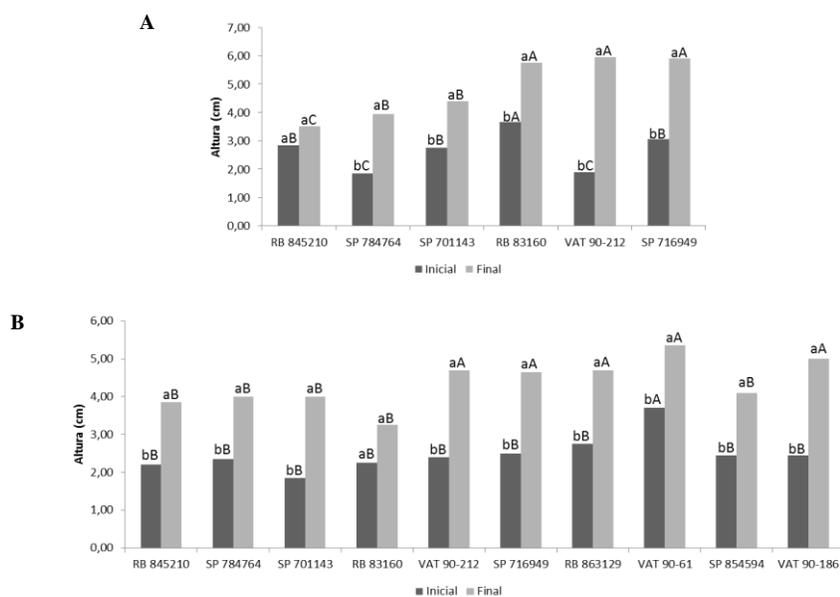


Figura 11 Comparação do desenvolvimento de brotações de cana-de-açúcar oriundas do meio líquido (A) e semissólido (B) quando cultivadas por 40 dias em meio de enraizamento contendo $\frac{1}{2}$ MS + 5,0 mg L⁻¹ de ANA. *Letras maiúsculas comparam as variedades no início e no final do enraizamento e letras minúsculas comparam a altura dentro de cada variedade pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras iguais pertencem a um mesmo grupo.

Algumas variedades apresentaram um melhor desenvolvimento da parte aérea, mas de modo geral, o vigor das plantas foi similar uma das outras no final do experimento. Pode-se observar que o meio de origem não influenciou no desenvolvimento das plantas nessa fase.

Assim como a parte aérea, a qualidade das raízes é essencial para o sucesso na etapa de aclimatização. Neste trabalho, observou-se a formação de raízes vigorosas e presença de muitos pelos radiculares. Não se verificou a formação de calos na base dos explantes e as raízes adventícias foram produzidas diretamente da porção basal das plantas (Figura 12A-C).

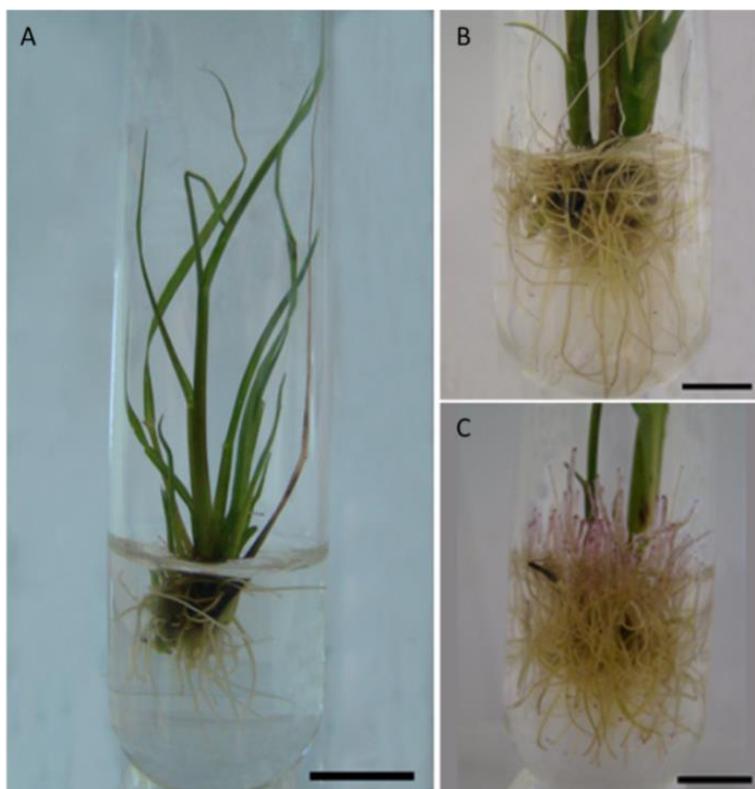


Figura 12 Aspecto visual de brotações de cana-de-açúcar após 40 dias em meio de enraizamento. A: Visão geral da parte aérea e sistema radicular desenvolvido (SP 854594); B: Proliferação de raízes pela brotação oriunda do meio semissólido (SP 716949); C: Proliferação de raízes pela brotação oriunda do meio líquido (RB 83160) (Barras = 1 cm).

Os protocolos já descritos para o enraizamento da cana-de-açúcar apresentam uma ampla variação com relação à concentração de sacarose e reguladores de crescimento, conforme observado abaixo.

Goel et al. (2010) relataram um aumento significativo na frequência de enraizamento em resposta ao incremento da concentração de ANA, de 2,0 para

7,0 mg L⁻¹. Contudo, a percentagem máxima (85,5%) e a maior qualidade das raízes foi encontrada na concentração de 5,0 mg L⁻¹ de ANA em combinação com 50 g L⁻¹ de sacarose. Resultados similares foram obtidos por Pathak et al. (2009) e Ramanand et al. (2007).

O ANA na concentração de 1,0 mg L⁻¹ proporcionou maior produção de raízes quando associado ao ácido indobutírico (AIB) e concentração de 3% de sacarose (Ali et al., 2008). Khan et al. (2009) relataram que o meio ótimo para enraizamento foi na presença de AIB, isoladamente, nas concentrações de 0,5 a 1,5 mg L⁻¹ juntamente com 6% de sacarose.

Uzma et al. (2012) verificaram o maior comprimento (9,0 cm) e número de raízes (20,5) em meio de ½ MS acrescido de 6% sacarose quando comparado com meio contendo ANA + AIA.

Diferentemente desses trabalhos, a sacarose na concentração de 30 g L⁻¹ juntamente com a auxina ANA foi suficiente para uma alta taxa de produção de raízes e de boa qualidade para todas as variedades aqui estudadas. Apenas o comprimento destas foi inferior, com média de 1,6 cm para ML e 1,3 cm para as brotações oriundas do meio MSS.

Como podemos verificar na Tabela 7, a sobrevivência das brotações multiplicadas e enraizadas *in vitro* foi de 80 a 100% quando transplantadas para substrato na casa de vegetação. De modo geral, todas as plantas que produziram raízes conseguiram se estabelecer *ex vitro*, demonstrando a importância dessa etapa para a finalização do sistema de micropropagação da espécie.

Tabela 7 Sobrevivência de variedades brasileiras de cana-de-açúcar durante o processo de aclimatização e número total de brotos após 3 semanas do estabelecimento em casa de vegetação.

Variedades	Sobrevivência (%)		N° Brotos	
	ML	MSS	ML	MSS
RB 845210	80,0 B	100,0 A	3,3 B	5,3 A
SP 784764	90,0 A	100,0 A	3,0 A	2,9 A
SP 701143	100,0 A	100,0 A	3,2 A	4,4 A
RB 83160	100,0 A	80,0 B	2,7 A	1,7 A
VAT 90-212	100,0 A	90,0 A	2,9 A	4,2 A
SP 716949	100,0 A	90,0 A	2,4 A	3,5 A
RB 863129	-	100,0 A	-	1,7 A
VAT 90-61	-	90,0 A	-	3,0 A
SP 854594	-	100,0 A	-	3,8 A
VAT 90-186	-	100,0 A	-	4,0 A

* Médias seguidas por mesma letra maiúscula dentro de cada variável não diferem entre si pelo Teste de F.

O número de brotos observados é referente aos formados ainda na fase de enraizamento *in vitro*, ou seja, durante a fase de aclimatização nenhum broto novo foi formado nesta condição (Tabela 6 e 7).

Com três semanas em substrato, as plantas se adaptaram bem ao ambiente externo e apresentaram um aumento significativo no comprimento da parte aérea de todas as variedades de cana-de-açúcar avaliadas (Figura 13A-C).

Assim como na fase de rizogênese, o meio de origem não interferiu no desenvolvimento das plantas em casa-de-vegetação.

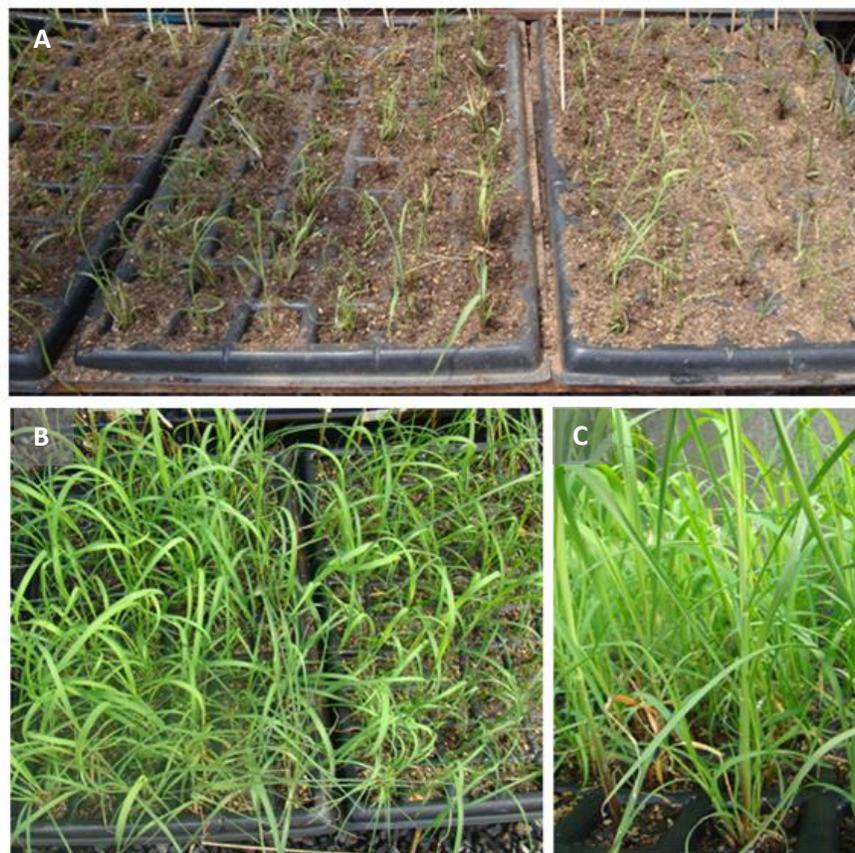


Figura 13 Adaptação das brotações de cana-de-açúcar micropropagadas ao processo de aclimatização em casa de vegetação. A: Dia da transferência das brotações para substrato de terra vegetal e areia; B e C: Crescimento e desenvolvimento das brotações após 21 dias do transplante.

Como uma típica planta C4, a resposta fotossintética tende a ser relativamente tolerante a diversas condições de estresse (CRAFTS-BRANDNER; SALVUCCI, 2002). De modo geral, esta característica foi

essencial para a sobrevivência das plantas de cana micropropagadas na nova condição ambiental.

4 CONCLUSÕES

- A regeneração de ápices caulinares de variedades brasileiras de cana-de-açúcar ocorre pela via direta e indireta em um período de aproximadamente 30 a 40 dias. Entretanto, o potencial organogênico é genótipo dependente.
- As variedades SP716949, VAT 90-186 e VAT 90-212 apresentam maior potencial organogênico.
- A multiplicação da cana-de-açúcar em meio de cultura líquido ou semissólido deve ser realizada em até no máximo 4 subcultivos consecutivos.
- As variedades SP 701143, RB 83160, RB 845210, SP 716949 e SP 854594 apresentam alta taxa de multiplicação *in vitro*.
- O cultivo *in vitro*, por período superior a quatro repicagens, induz a formação de variações morfológicas e alteram o conteúdo relativo de DNA nuclear em pelo menos 30% das plantas de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- ALI, A. et al. An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 139-149, Feb. 2008.
- ANDRADE, G. R. D. **Resposta do sistema antioxidativo sob a influência de 6-benzilaminopurina na micropropagação de cana-de-açúcar**. 2011. 75 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. van. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation: an international journal on plant growth and development**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 147-173, Mar. 2011.
- BASNAYAKE, S. W. V.; MOYLE, R.; BIRCH, R. G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 439-448, Mar. 2011.
- BEDNAREK, P. T. et al. Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 10, Mar. 2007.
- BENNETZEN, J. L.; MA, J.; DEVOS, K. M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 127-132, 2005.
- BIRADAR, S. et al. *In vitro* plant regeneration using shoot tip culture in commercial cultivar of sugarcane. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 22, n. 1, p. 21-24, 2009.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396-398, May 2007.

BRITO, G. et al. Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. **Trees**, v. 24, n. 4, p. 723-732, Aug. 2010.

CAMPOS, J. M. S. et al. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 38-44, Jan. 2009.

CHE, P. et al. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 620-637, June 2006.

CHEEMA, K. L.; HUSSAIN, M. Micropropagation of sugarcane through apical bud and axillary bud. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 6, n. 2, p. 257-259, 2004.

CIDADE, D. A. D. et al. *In vitro* morphogenesis of Brazilian sugarcane varieties. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, Mar. 2006.

CLARINDO, W. R. et al. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 92, n. 2, p. 207-214, Feb. 2008.

CRAFTS-BRANDNER, S. J.; SALVUCCI, M. E. Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize, to heat stress. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, n. 4, p. 1773-1780, Aug. 2002.

DIBAX, R. et al. Protocol optimization and histological analysis of *in vitro* plant regeneration of RB 92579 and RB 93509 sugarcane cultivars. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 1, p. 49-54, jan. 2013.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVAK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear-DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, 1994.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. **Flow cytometry with plants cells**. [Weinheim]: J. Wiley-VCH, 2007. 454 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FRANKLIN, G. et al. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) midrib segment explants. **Plant Growth Regulation: an international journal on plant growth and development**, Dordrecht, v. 50, n. 2-3, p. 111-119, Nov. 2006.

GARCIA, R. et al. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type of growth regulator. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 90, n. 2, p. 181-190, Aug 2007.

GILL, R.; MALHOTRA, P. K.; GOSAL, S. S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 84, n. 2, p. 227-231, Feb. 2006.

GOEL, Y. et al. *In vitro* morphogenesis in leaf sheath explants of sugarcane hybrid var. CoS 99259. **Sugar Tech**, v. 12, n. 2, p. 172-175, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. et al. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: [s. n.], 1998. v. 1, p. 509.

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

HONDA, C. et al. Transformation of kiwi fruit using the IPT gene alters tree architecture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 45-53, Oct. 2011.

HUANG, H. et al. Variations in leaf morphology and DNA methylation following *in vitro* culture of *Malus xiaojinensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 111, n. 2, p. 153-161, Nov. 2012.

JIN, S. et al. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 8, p. 1303-1316, Aug. 2008.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: [s. n.], 1940. 523.

KHAN, I. A.; KHATRI, A. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: histological studies. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, p. 631-636, 2006.

KHAN, S. A. et al. Optimization of explant sterilization condition in sugarcane cultivars. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 20, n. 3-4, p. 119-123, 2007.

KHAN, S. A. et al. Rapid micropropagation of three elite Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 13, p. 2174-2180, July 2008.

KHAN, S. A. et al. Effect of cytokinins on shoot multiplication in three elite sugarcane varieties. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 4, p. 1651-1658, Aug. 2009.

KHARABIAN, A.; DARABI, A. Characterization of some chromosomal aberrations in regenerated rice plants (*Oryza sativa*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 83, n. 2, p. 161-168, Nov. 2005.

LAKSHMANAN, P. et al. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, Oct. 2006.

- LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell-cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.
- LI, R.; BRUNEAU, A. H.; QU, R. Tissue culture-induced morphological somaclonal variation in St. Augustinegrass *Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze. **Plant Breeding**, v. 129, n. 1, p. 96-99, Feb. 2010.
- LORENZO, J. C. et al. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2001.
- LOUREIRO, J. et al. Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 51, n. 1, p. 7-14, 2007.
- MALLON, R.; RODRIGUEZ-OUBINA, J.; LUZ GONZALEZ, M. *In vitro* propagation of the endangered plant *Centaurea ulreia*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 101, n. 1, p. 31-39, Apr. 2010.
- MARALAPPANAVAR, M. S.; KURUVINASHETTI, M. S.; HARTI, C. C. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Euphytica**, Wageningen, v. 115, n. 3, p. 173-180, 2000.
- MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant dna histograms, with 2C-values for 70 species. **Biology of the Cell**, v. 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993.
- MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, July 2011.
- MIYAO, A. et al. Molecular spectrum of somaclonal variation in regenerated rice revealed by whole-genome sequencing. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 53, n. 1, p. 256-264, Jan. 2012.
- MSOGOYA, T. J.; GROUT, B. W.; ROBERTS, A. Reduction in genome size and DNA methylation alters plant and fruit development in tissue culture induced

off-type banana (*Musa* spp.). **Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 11, n. 3, p. 1450-1456, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue o. **Protoplasma**, New York, v. 59, n. 2, p. 368, 1964.

OZYIGIT, II. Phenolic changes during *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 1145-1150, Apr. 2008.

PANDEY, R. N. et al. Early assessment of genetic fidelity in sugarcane (*Saccharum officinarum*) plantlets regenerated through direct organogenesis with RAPD and SSR markers. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 4, p. 618-624, 2012.

PATHAK, S. et al. Effect of growth regulators on *in vitro* multiplication and rooting of shoot cultures in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 11 n. 1, p. 86-88, 2009.

PETROV, D. A. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 1, p. 23-28, Jan. 2001.

PIPERIDIS, G.; PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 284, n. 1, p. 65-73, July 2010.

PRADO, M. J. et al. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 103, n. 1, p. 49-59, Oct. 2010.

QUIALA, E. et al. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. **Plant Cell Tissue**

and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 223-234, May 2012.

RAJESWARI, S. et al. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and evaluation for quantitative and quality traits. **Euphytica**, Wageningen, v. 168, n. 1, p. 71-80, July 2009.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Cytokinin-induced abnormal shoot organogenesis is associated with elevated *Knotted1*-type homeobox gene expression in tobacco. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, n. 12, p. 919-924, July 2004.

RAMANAND et al. Optimization of rooting in micropropagated shoots of sugarcane **Sugar Tech**, v. 9, n. 1, p. 95-97, 2007.

RASHEED, S. et al. RAPD characterization of somaclonal variation in indica basmati rice. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n. 2, p. 249-262, June 2005.

ROCHA, D. I. et al. Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell Tissue and Organ Culture:** an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 111, n. 1, p. 69-78, Oct. 2012.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. **Plant Cell Tissue and Organ Culture:** an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 263-269, May 2012.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. D. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.

SENGAR, R. S.; SENGAR, K.; GARG, S. K. Biotechnological approaches for high sugarcane yield. **Plant Sciences Feed**, v. 1, n. 7, p. 101-111, 2011.

SHAPIRO, H. M. The evolution of cytometers. **Cytometry Part A**, v. 58A, n. 1, p. 13-20, Mar. 2004.

SILVA, C. V. et al. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 107, n. 3, p. 407-416, Dec. 2011.

SINGH, G. et al. *In vitro* induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane. **Euphytica**, Wageningen, v. 160, n. 1, p. 35-47, Mar. 2008.

SINGH, N.; KUMAR, A.; GARG, G. K. Genotype dependent influence of phytohormone combination and subculturing on micropropagation of sugarcane varieties. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 99-106, 2006.

SNYMAN, S. J. et al. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 2, p. 234-249, May 2011.

SIVANESAN, I.; JEONG, B. R. Identification of somaclonal variants in proliferating shoot cultures of *Senecio cruentus* cv. Tokyo Daruma. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 111, n. 2, p. 247-253, Nov. 2012.

SUPRASANNA, P. et al. Profiling of culture-induced variation in sugarcane plants regenerated via direct and indirect somatic embryogenesis by using transposon- insertion polymorphism. **Sugar Tech**, v. 12, n. 1, p. 26-30, 2010.

TAYLOR, P. W. J. et al. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 7-8, p. 1169-1173, June 1995.

TEXEIRA, L. R. et al. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 33, n. 1, p. 67-74, Jan./Mar. 2011.

UZMA, M. R. K. et al. Rapid *in vitro* multiplication of sugarcane elite genotypes and detection sugarcane mosaic through two steps RT-PCR. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, n. 6, p. 870-878, 2012.

VIEIRA, R. A. et al. Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação *in vitro* das variedades RB 867515 e RB 855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 122-126, 2009.

WANG, Q. M.; WANG, L. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 9, p. 1535-1547, Sept. 2012.

YANG, J. L. et al. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) root explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 100, n. 1, p. 49-58, Jan. 2010.

ZHANG, M. S. et al. Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F-1 hybrids of sorghum pure lines are accompanied by increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases. **Plant Journal**, v. 57, n. 4, p. 666-679, Feb. 2009.

ZUCCHI, M. I. et al. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 91-95, Mar. 2002.

CAPÍTULO 3

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE VARIEDADES BRASILEIRAS
DE CANA-DE-AÇÚCAR E ANÁLISE MORFO-
HISTOLÓGICA DE ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO**

RESUMO

Uma das maiores limitações dos protocolos de regeneração *in vitro* e da transformação genética de plantas está relacionada com a utilização de material de campo como fonte de explante, seja pela falta de uniformidade dos indivíduos, seja pelos inconvenientes adicionais, como oxidação fenólica e contaminação por micro-organismos. Objetivou-se neste trabalho avaliar o potencial embriogênico de quatorze variedades brasileiras de cana-de-açúcar utilizando como fonte de explantes plantas previamente estabelecidas *in vitro*, bem como verificar a capacidade morfogênica dos calos ao longo de subcultivos consecutivos. Inicialmente, determinou-se o tamanho ideal do explante a ser utilizado. O meio de indução utilizado foi constituído de sais e vitaminas do MS suplementado com 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D sob condições de escuro. A partir da primeira avaliação, aos 40 dias de cultivo, os calos foram seccionados de acordo com o seu tipo de células: a parte mucilaginosa permaneceu em novo meio de indução e a parte nodular foi transferida para meio de regeneração, contendo 1,86 mg L⁻¹ de ANA e 0,09 mg L⁻¹ de BAP, na presença de luz. Este procedimento ocorreu por mais dois subcultivos. Como resultados, observou-se maior formação de calos primários em explantes de tamanho inicial de aproximadamente 12 mm. O desenvolvimento de calos embriogênicos e a frequência de regeneração foi genótipo dependente. O processo embriogênico foi assincronizado e, a partir da sexta semana de cultivo foi possível observar a formação das primeiras plantas. As variedades RB 83160, SP 813804, RB 99395, CB 45-3, VAT 90-61, VAT 90-212 e SP 854594 mantiveram a capacidade morfogênica no tempo, embora se tenha observado um retardamento do processo regenerativo, a partir do envelhecimento dos calos. De maneira geral, o potencial embriogênico das variedades de cana-de-açúcar associado com a eficiência e rapidez de regeneração proporcionam uma alternativa de utilização do método em estudos de transgenia e/ou multiplicação clonal da espécie.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Regeneração. Subcultivos. Capacidade morfogênica.

ABSTRACT

One of the major limitations of protocols for *in vitro* regeneration and genetic transformation of plants is related to the use of field material as explant source, due to the lack of uniformity of individuals, or by additional drawbacks such as phenolic oxidation and contamination by microorganisms. This study aimed to evaluate the embryogenic potential of fourteen varieties of Brazilian sugarcane using plants previously established *in vitro* as explante source, and to verify the ability of morphogenic calli along consecutive subcultures. Initially, we determined the optimal size of the explant to be used. The induction medium used consisted of MS salts and vitamins supplemented with 3.0 mg L⁻¹ 2,4-D and explants were maintained in the dark. Starting from the first evaluation, 40 days of culture, the calli were sectioned according to its cell type, i.e. the mucilaginous part remained in fresh induction medium and the nodular portion was transferred to regeneration medium containing 1.86 mg L⁻¹ ANA and 0.09 mg L⁻¹ BAP in the presence of light. This occurred for two subcultures. As a result, there was higher primary calli formation in explants of initial size of about 12 mm. The development of somatic embryogenesis and regeneration frequency was genotype dependent. The embryogenic process was asynchronous, but from the sixth week of cultivation on, it was possible to observe the formation of the first plantlets. The varieties RB 83160, SP 813804, RB 99395, CB 45-3, VAT 90-61, VAT 90-212 and SP 854594 maintained morphogenic capacity over time, although we observed a slowing of the regenerative process, from the aging of calli. In general, the embryogenic potential of the varieties of sugarcane associated with the regeneration efficiency and speed provide an alternative use of the method in studies involving transgenic and/or micropropagation of the species.

Keywords: *Saccharum* sp. Regeneration. Subcultures. Morphogenic capacity.

1 INTRODUÇÃO

Introduzida no período colonial, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) transformou-se em uma das principais culturas da economia brasileira. O Brasil não é apenas o maior produtor de cana-de-açúcar, mas também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol (PEZZO; AMARAL, 2007; BRASIL, 2013).

A área cultivada com cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 está estimada em 8.520,5 mil hectares, distribuídas em todos os estados produtores. A produtividade média brasileira será de aproximadamente 69.846 kg/ha (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2012). De acordo com Cheavegatti-Gianotto et al. (2011), a produção brasileira deve praticamente dobrar nos próximos anos.

Neste sentido, aumentos adicionais no rendimento da cana-de-açúcar são esperados a partir do uso auxiliar de ferramentas biotecnológicas. Na última década, esforços substanciais têm sido dispendidos para desenvolver um sistema eficiente de transformação genética da cultura (SENGAR; SENGAR; GARG, 2011).

Diferentes técnicas de transformação como eletroporação (SEEMA et al. 2001), bombardeamento de partículas (TAPARIA; GALLO; ALTPETER, 2012) e transferência de genes mediado por *Agrobacterium* (MANICKAVASAGAM et al., 2004; JOYCE et al., 2010) vêm sendo estudadas, visando a introdução de genes de interesse agrônomo e industrial à espécie. Mas, para isso, o tipo de explante e a via morfogênica precisam necessariamente de estar previamente bem definidos.

Pela teoria da totipotencialidade, qualquer parte viva da planta poderia ser utilizada como material vegetal (SILVA; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012). Entretanto, meristemas e discos foliares têm se mostrado ineficientes na produção de plantas de cana-de-açúcar transgênicas (SNYMAN et al., 2006). De maneira geral, calos embriogênicos têm sido o tecido preferido, principalmente, por possuírem maior proporção de células capazes de proliferarem e regenerarem sob condições adequadas de cultivo (BASNAYAKE; MOYLE; BIRCH, 2011).

Apesar de alguns protocolos de embriogênese somática já estarem bem estabelecidos, estes não se aplicam universalmente a todas as variedades de cana-de-açúcar, uma vez que diversos fatores influenciam a regeneração e a estabilidade genética das plantas *in vitro*, tais como genótipo, tipo de explante, condições de cultivo e combinação destes (SNYMAN et al., 2011).

Ademais, a maioria dos protocolos envolvem folhas imaturas oriundas de ápices caulinares coletados de plantas do campo que, de acordo com Garcia et al. (2007), não apresentam uniformidade fisiológica entre os indivíduos e/ou nas diferentes estações do ano, o que dificulta a reprodutibilidade do método. Além disso, existem os inconvenientes adicionais como a elevada taxa de contaminação por micro-organismos e liberação de grande quantidade de compostos fenólicos.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar o potencial embriogênico de quatorze variedades brasileiras de cana-de-açúcar utilizando plantas *in vitro* como fonte de explante, bem como avaliar a capacidade morfogênica e a frequência de regeneração dos calos após subcultivos consecutivos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Determinação do explante para a indução da embriogênese somática

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília-DF.

Para verificar a influência do tamanho e da posição dos explantes na indução de calos embriogênicos, inicialmente brotações de duas variedades de cana-de-açúcar (RB 855453 e IAC 862210) previamente estabelecidas *in vitro* por cultura de meristema foram utilizadas como fonte de explante.

Em câmara de fluxo laminar, os perfilhos foram isolados da matriz e seccionados em diferentes tamanhos da base para o ápice: 1,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 e 15,0 mm. Em seguida, os explantes foram inoculados em meio de cultura contendo sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3,0 mg L⁻¹ de 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (HO; VASIL, 1983) e solidificado com 2,3 mg L⁻¹ de *Phytigel*® (SIGMA). O pH do meio foi ajustado para 5.8±0,1 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos.

Nesta fase de indução e desenvolvimento dos calos com duração de aproximadamente 40 dias de cultivo, os explantes foram mantidos em condição de escuro, sob temperatura de 25±2 °C.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial (2 variedades x 6 tamanhos) e, como repetição utilizaram-se 3 placas de *Petri* (15 x 90 mm) contendo 5 brotos posicionados horizontalmente ao meio.

A taxa média de formação de calos primários e a sua posição no explante (base, mediano ou ápice) foi avaliada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico Sisvar® (FERREIRA, 2011), sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os dados de percentagem foram transformados por arco-seno com intuito de atender os pressupostos necessários para a realização das análises.

2.2 Potencial embriogênico das variedades brasileiras de cana-de-açúcar

Para a verificação do potencial embriogênico de variedades brasileiras de cana-de-açúcar, quatorze variedades estabelecidas *in vitro* por organogênese foram utilizadas como fonte de explante (Tabela 1).

Tabela 1 Relação de variedades brasileiras de cana-de-açúcar utilizadas no experimento de embriogênese somática a partir de explantes previamente estabelecidos *in vitro*.

RB 83160	SP 813804
SP 716949	SP 813250
RB 863129	SP 851431
VAT 90-186	RB 99395
CB 45-3	VAT 90-61
VAT 90-212	SP 854594
SP 701143	RB 951541

Inicialmente, em câmara de fluxo laminar, perfilhos isolados das matrizes foram inoculados em meio de MS suplementado com 3,0 mg L⁻¹ de

2,4-D para indução de calos embriogênicos. O tamanho inicial dos explantes utilizados foi de aproximadamente 1,2 milímetros, conforme resultados encontrados no item 2.1.

Como repetição, utilizaram-se 5 placas de *Petri* com 5 brotos posicionados horizontalmente no meio de cultura para cada variedade. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz e temperatura de 25 ± 2 °C, por um período de 40 dias.

Transcorrido este tempo, a formação de calos primários com aspecto mucilaginoso e embriogênicos nodulares e evidenciados pela coloração esbranquiçada foi avaliada. Em seguida, os calos primários foram transferidos para novo meio de cultura contendo a mesma concentração de 2,4-D e mantidos na condição de escuro, caracterizando o 2º subcultivo em meio de indução. Já os calos embriogênicos foram inoculados em meio de regeneração contendo $1,86 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético (ANA) e $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ de benzilaminopurina (BAP) (TAPARIA; GALLO; ALTPETER, 2012) e transferidos para condição de luminosidade em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e irradiação de $30 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Ressalta-se que em alguns casos, o calo foi seccionado conforme o estágio de desenvolvimento, onde a porção primária continuou a ser cultivada em 2,4-D e a porção embriogênica transferida para meio de regeneração.

Após quarenta dias de cultivo, os calos primários que permaneceram no meio de indução foram avaliados quanto à formação de novos calos ou porções embriogênicas. Os calos embriogênicos em meio de regeneração foram avaliados quanto à percentagem de área verde, contendo embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, e o número de brotos formados ($> 5 \text{ mm}$).

Em seguida, realizou-se novamente a subdivisão dos calos de acordo com os tipos de células e os mesmos procedimentos de inoculação, ou seja, a parte mucilaginosa (primária) continuando em meio de indução e a parte embriogênica transferida para meio de regeneração.

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados em esquema de parcela subdividida no tempo pelo programa estatístico Sisvar. As médias de percentagem foram previamente transformadas por arco-seno e os dados obtidos por contagem segundo $(x+1)^{0.5}$. As médias foram comparadas pelo Teste de F e Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

2.3 Análise histológica

Para a análise histológica, amostras de calos primário e nodulares foram coletados e fixados em FAA 70 (Formaldeído, ácido acético e etanol 70%, em razão de 1:1:18 v/v) (Johansen, 1940).

Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente (70-100%), infiltradas e incluídas em historresina (Leica®) de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes seriados transversais e longitudinais (7-10 μ m) foram obtidos em micrótomo rotatório manual (Leica modelo RM 2125), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida a 40°C.

Os cortes foram corados com azul de Toluidina (O' BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964), seguido da montagem entre lâmina-lamínula com Entellan. Os resultados foram registrados em fotomicroscópio, acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Software ImagePro 4.0).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do explante para a indução da embriogênese somática

Os resultados encontrados demonstraram que o tamanho inicial do explante apresenta uma relação estreita com a percentagem de formação de calos primários e sua proliferação. Não houve diferenças estatísticas entre as duas variedades estudadas.

Inicialmente, aos cinco dias após a inoculação dos perfilhos em meio de MS suplementado com $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D observou-se a formação de calos na parte basal, próximo à região meristemática, independentemente do tamanho inicial do explante. Além disso, constatou-se que foram as lâminas foliares mais internas que deram origem às primeiras massas calogênicas de coloração amarelada e aspecto mucilaginoso.

Estes resultados estão de acordo com Garcia et al. (2007), nos quais verificaram a origem dos calos de cana-de-açúcar nas células da bainha do feixe vascular de folhas imaturas. Ao longo do cultivo, estas massas se multiplicaram e atravessaram os tecidos não responsivos.

Aos quarenta dias de cultivo, a percentagem de formação de calos primários nas duas variedades de cana-de-açúcar foi significativamente influenciada pelo tamanho dos explantes iniciais utilizados. Na Figura 1, pode-se verificar que explantes com tamanho superiores a 9 mm foram os mais responsivos, com média de aproximadamente 76% quando comparados com os demais (50%).

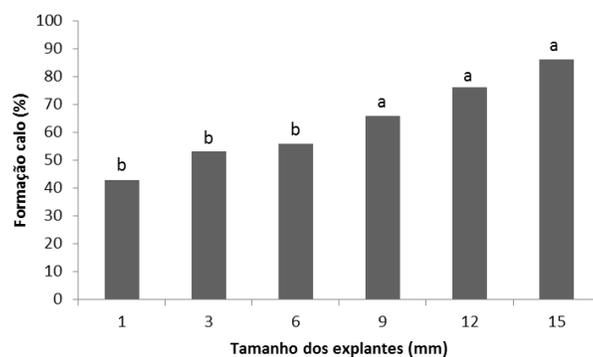


Figura 1 Influência do tamanho do explante na formação de calos primários de cana-de-açúcar em meio de cultura de MS suplementado com $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4 D. * Médias seguidas por mesma letra, pertencem ao mesmo grupo, pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Explantos iniciais com tamanho de 1 mm apresentaram formação de calos em apenas 40% dos explantes inoculados em meio de cultura contendo $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Provavelmente, a forte oxidação fenólica, observada em todo o explante, prejudicou o desenvolvimento das massas calogênicas.

Ao contrário, nos explantes de maior tamanho, a oxidação ocorreu na parte apical dos explantes e não interferiu na proliferação dos calos na parte oposta.

Verificou-se também que a cobertura do calo em torno do explante inicial foi significativamente influenciada pelo tamanho dos perfishos.

Os explantes com tamanhos iniciais de 1 e 3 mm apresentaram uma cobertura de 100 e 91% do explante, respectivamente, ou seja, praticamente todo o explante inicial foi coberto por calo. Já os tamanhos superiores a 6 mm apresentaram formação e proliferação das massas calogênicas somente na região

basal e intermediária (Figura 2). Estes resultados demonstram a variação do potencial morfogênico das diferentes áreas do segmento foliar, e corroboram com Guiderdoni e Demarly (1988).

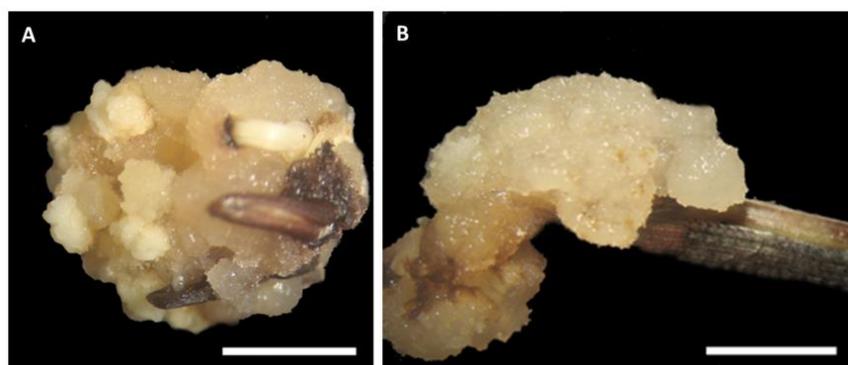


Figura 2 Indução de calos primários de cana-de-açúcar a partir de explantes com diferentes tamanhos iniciais. A: Explante inicial de 1 mm e cobertura total dos calos; B: Explante inicial de 12 mm e formação de calos na parte basal. (Barras = 0,5 cm).

Diante dos resultados obtidos, preconizou-se o uso de explantes iniciais com tamanho aproximado de 12 mm, medidos a partir da parte basal, retirando-se uma ou duas folhas externas dos perfilhos antes da inoculação, a fim de facilitar a formação inicial das massas calogênicas.

Uma vez determinadas as particularidades do processo de indução de calos primários a partir de plantas de cana-de-açúcar previamente estabelecidas *in vitro*, estes procedimentos foram utilizados na verificação do potencial embriogênico de outras variedades brasileiras de grande interesse econômico, principalmente na região nordeste do País.

3.2 Potencial embriogênico das variedades brasileiras de cana-de-açúcar

As variedades de cana-de-açúcar avaliadas responderam de maneira significativa aos procedimentos adotados e atingiram uma taxa média de 94% de formação de calos primários.

A formação inicial dos calos foi verificada a partir da primeira semana de cultivo *in vitro*, com desenvolvimento de células indiferenciadas na parte basal dos explantes, ou seja, próximo à região meristemática.

A proliferação destas células ocorreu nas primeiras semanas de cultivo, dando origem a calos friáveis de aspecto mucilaginoso e coloração amarelada. Todavia, a partir da terceira semana *in vitro*, verificou-se o surgimento de um calo compacto nodular de coloração esbranquiçada sobre o tecido mucilaginoso.

De acordo com Ho e Vasil (1983), o calo mucilaginoso é macio, brilhante, não embriogênico e consiste de células alongadas e dissociadas. Já os calos compactos brancos consistem de células pequenas, com citoplasma denso e que, em condições ideais de cultivo, dão origem aos embrioides diferenciados.

Apesar da eficiência na indução de calos primários para todas as variedades avaliadas, pode-se verificar que o desenvolvimento de calos ou porções embriogênicas foi genótipo dependente e variou significativamente ao longo de três subcultivos consecutivos (Figura 3).

De modo geral, dois comportamentos foram constatados dentre as variedades testadas. O primeiro envolveu quatro variedades (RB 863129, SP 813804, CB 45-3 e SP 813250) com alta capacidade de produção de calos embriogênicos nos primeiros subcultivos e um rápido declínio com o passar do tempo. O segundo comportamento caracterizou a maioria das variedades, as

quais apresentaram frequência constante na produção de calos ou porções embriogênicas, nos três cultivos analisados. Neste último grupo, as variedades com maior produção de calos embriogênicos por explantes foram VAT 90-61, VAT 90-212, SP 701143 e SP 716949 (Figura 3).

A variedade SP 854594 foi a única que apresentou um comportamento distinto das demais, com um pico de produção de calos embriogênicos apenas no segundo subcultivo (aproximadamente 40% dos explantes) (Figura 3).

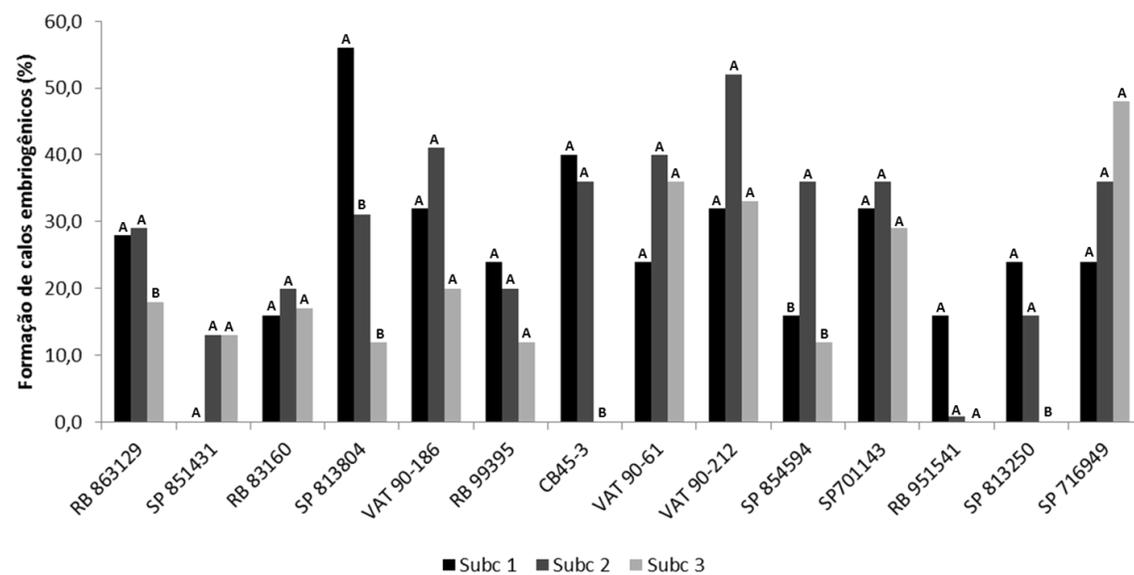


Figura 3 Potencial de formação de calos embriogênicos de variedades brasileiras de cana-de-açúcar ao longo de subcultivos consecutivos no meio de cultura de MS suplementado com $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. *Letras iguais dentro de cada variedade pertencem ao mesmo grupo pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Através deste acompanhamento dos calos no tempo, pode-se observar que os calos primários de aspecto mucilaginoso (Figura 4A) que produziram porções embriogênicas sobre o seu tecido no primeiro subcultivo (Figura 4B), na maioria das vezes, foram capazes de produzir novamente nos subcultivos sucessivos, ou seja, mantiveram a capacidade morfogênica quando mantidos no meio de indução ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D).

A manutenção da cultura de calos em um estado regenerável por períodos prolongados de tempo é um dos requisitos para a utilização das técnicas *in vitro* na engenharia genética de plantas (POLA; MANI; RAMANA, 2009). Entretanto, esta só se torna viável se a capacidade de regeneração também for sustentada ao longo do tempo de cultivo.

Neste trabalho, os calos ou as porções embriogênicas transferidas para o meio de regeneração logo se proliferaram, formando mais calos compactos nodulares brancos. Entretanto, resíduos de calo primário, permitiram a formação de novos tecidos mucilaginosos que, aparentemente, não interferiram na diferenciação dos embriões do tecido nodular adjacente.

De modo geral, estruturas globulares foram produzidas na periferia dos calos morfogênicos brancos em aproximadamente dez dias de cultivo, seguidos pelo desenvolvimento do coleóptilo e germinação das primeiras plantas de origem somáticas.

Nesta fase, pode-se observar com clareza o assincronismo do processo embriogênico das variedades de cana-de-açúcar. Na Figura 4C, é possível distinguir em um mesmo cluster estruturas globulares, embriões somáticos com escutelo e coleóptilo, áreas verdes de regeneração contendo embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento, além de brotos regenerados.

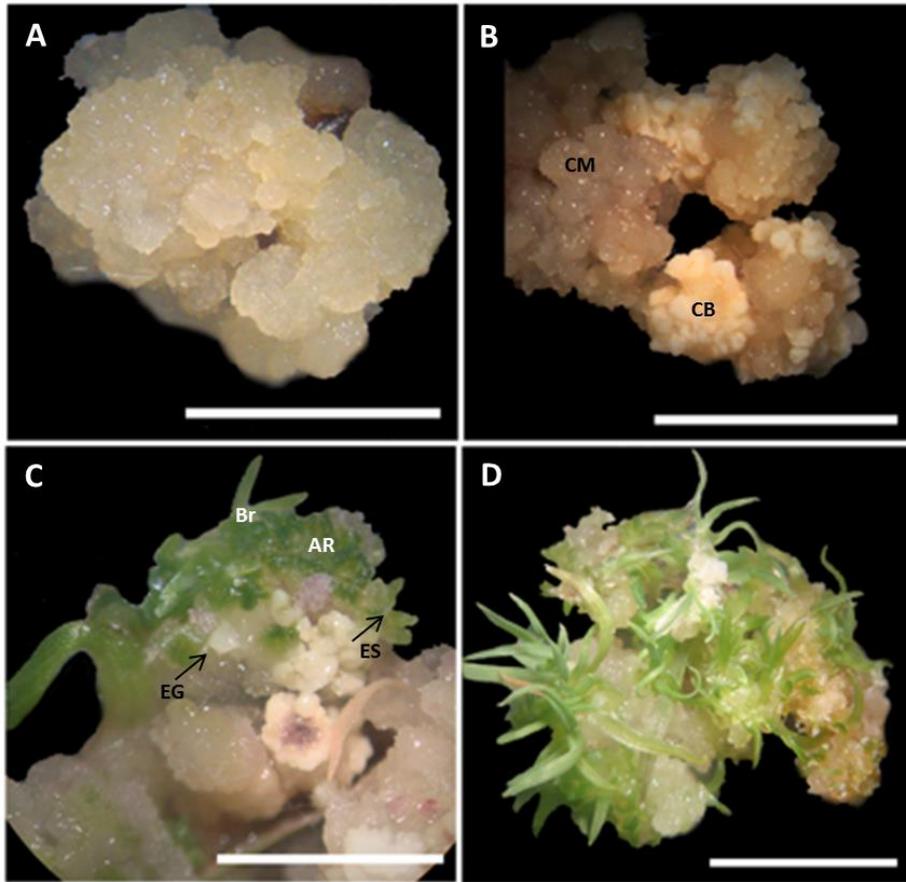


Figura 4, continua...

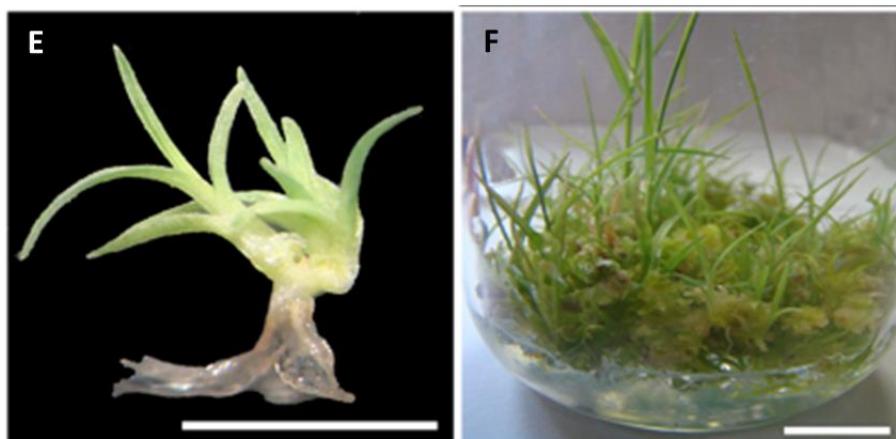


Figura 4 Embriogênese somática induzida a partir de plantas de cana-de-açúcar previamente estabelecidas in vitro. A: Calo mucilaginoso formado em meio de MS suplementado com 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D; B: Calo compacto nodular de coloração esbranquiçada formado sobre o tecido mucilaginoso; C: Assincronismo do processo embriogênico aos 10 dias após a transferência para meio de regeneração contendo 1,86 mg L⁻¹ de ANA e 0,09 mg L⁻¹ de BAP; D: Formação de plântulas após 40 dias de cultivo em meio de regeneração; E: Plântulas completas isoladas do tecido embriogênico; F: Crescimento e desenvolvimento das plantas regeneradas via embriogênese somática. CM: calo mucilaginoso, CB: calo morfogênico branco, EG: estrutura globular, AR: área de regeneração evidenciada pela coloração verde, ES: embriões somáticos, Br: brotos regenerados. (Barras A, B, C, D e E = 0,5 cm e F = 1,0 cm).

Essa assincronia e rapidez de resposta podem ser explicadas pelo fato de pró-embrioides e embrioides completos já terem sido produzidos pelos calos compactos nodulares de cana, ainda no meio de indução (HO; VASIL, 1983).

Garcia et al. (2007) verificaram a formação de embriões globulares aos 15 dias, embriões maduros aos 25 dias e a conversão de plantas aos 30 dias, após a transferência para o meio de regeneração desprovido de reguladores de crescimento, sob condições de luminosidade. Embora esses autores também

tenham utilizado explantes *in vitro* como fonte de explante, o processo de regeneração destes foi mais tardio que o observado neste trabalho, em que aos 15 dias em meio de regeneração já foi possível verificar a formação de plantas de cana-de-açúcar.

Além do desenvolvimento de embriões somáticos, alguns relatos na literatura reportaram a formação de gemas adventícias a partir de calos nodulares caracterizando, assim, a ocorrência simultânea das vias organogênica e embriogênica em calos de cana-de-açúcar (FALCO et al., 1996; KHAN; KHATRI, 2006).

De maneira geral, no primeiro subcultivo em meio contendo ANA e BAP, o processo de regeneração das variedades de cana-de-açúcar ocorreu em 100% dos explantes transferidos para meio de regeneração e expostos a condições de luminosidade (Figura 4D-F). Todavia, a percentagem de área verde contendo embriões em diferentes estádios de desenvolvimento e o número médio de brotos formados por explante variou significativamente entre as variedades (Tabela 2).

Tabela 2 Percentagem de regeneração dos calos embriogênicos, área média de regeneração evidenciada pela coloração verde e número médio dos brotos após quarenta dias de transferência para meio de regeneração (MS + 1,86 mg L⁻¹ de ANA + 0,09 mg L⁻¹ de BAP) e exposição à luz. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 2013.

Variedade	Regeneração			Área de regeneração (%)			N° de brotos		
	Subc 1	Subc 2	Subc 3	Subc 1	Subc 2	Subc 3	Subc 1	Subc 2	Subc 3
RB 863129	100 aA	80 aA	40 bB	31 bA	28 bA	10 aA	5,5 bA	8,6 aA	0,3 aB
RB 83160	100 aA	100 aA	100 aA	26 bA	30 bA	40 aA	9,7 bA	4,5 bA	6,3 aA
SP 813804	100 aA	85 aA	100 aA	52 bA	40 aA	20 aA	15,3 aA	10,0 aA	0,4 aB
VAT 90-186	100 aA	50 bB	0,0 bC	54 bA	10 bB	0,0 aB	10,4 bA	0,2 bB	0,0 aB
RB 99395	100 aA	62 aA	66 aA	51 bA	10 bB	17 aB	16,2 aA	1,4 bB	0,5 aB
CB 45-3	90 aA	80 aA	66 aA	48 bA	14 bB	10 aB	11,5 bA	2,0 bB	1,33 aB
VAT 90-61	100 aA	100 aA	77 aA	76 aA	29 bB	18 aB	19,5 aA	2,8 bB	1,5 aB
VAT 90-212	100 aA	85 aA	60 aA	74 aA	57 aA	10 aB	20,5 aA	10,0 aB	0,2 aC
SP 854594	100 aA	88 aA	100 aA	58 aA	27 bB	28 aB	15,7 aA	7,0 aB	4,2 aB
SP 701143	100 aA	75 aA	33 bB	74 aA	10 bB	15 aB	23,3 aA	1,67 bB	0,2 aB
RB 951541	100 aA	0,0 cB	-**	75 aA	0,0 bB	-	10,0 bA	0,0 bA	-
SP 813250	100 aA	75 aA	-	61 aA	29 bB	-	23,0 aA	2,6 bB	-
SP 716949	100 aA	71 aA	44 bB	75 aA	53 aA	10 aB	14,0 bA	17,0 aA	0,6 aB

* Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna e letra maiúscula dentro de cada variável não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. **Não houve formação de calos embriogênicos.

Morfológicamente verificou-se que as plantas formadas foram aparentemente normais e, em alguns casos, completas com formação de parte aérea e sistema radicular.

As variedades que se destacaram com relação ao número de brotos formados foram VAT 90-61, VAT 90-212, SP 701143, SP 813250, SP 813804, RB 99395 e SP 854594, com média de 19,0 brotos por explante (Tabela 2).

Estes resultados comprovam a eficiência do meio de regeneração descrito por Taparia, Gallo e Altpeter (2012) e demonstram o potencial da embriogênese somática da cana-de-açúcar estabelecida a partir de plantas *in vitro*. Ademais, o seccionamento dos calos de acordo com o tipo de células e inoculação no meio adequado, permitiu a continuidade de produção de brotos nos subcultivos posteriores.

Contudo, ao contrário do primeiro subcultivo, a percentagem de regeneração dos calos compactos nodulares brancos oriundos do segundo subcultivo variou significativamente entre as variedades estudadas. De acordo com a Tabela 2, pode-se verificar que onze variedades mantiveram o alto nível de regeneração dos calos.

A variedade VAT 90-186 apresentou uma taxa de regeneração inferior à primeira. Neste caso, embora a formação de calos ou porções embriogênicas tenha se mantido constante no tempo (Figura 3), observou-se um declínio no potencial de regeneração dos mesmos. Já a variedade RB 951541 não apresentou sinais de regeneração a partir do segundo subcultivo.

A variedade SP 851431, apesar de ter produzido calos embriogênicos em 13% dos explantes, a regeneração dos mesmos não ocorreu nas condições empregadas.

No segundo subcultivo, observou-se que a área de regeneração evidenciada pela coloração verde foi reduzida para a maioria das variedades, e o número de brotos formados foi menor. No dia da avaliação, poucos brotos apresentavam tamanho suficiente para serem contabilizados (± 5 mm), demonstrando que a regeneração foi retardada com o tempo de cultivo (Tabela 2).

Ainda assim, os níveis de regeneração observadas neste último subcultivo foram satisfatórios, quando comparados com outros trabalhos encontrados na literatura.

Singh et al. (2008) verificaram eficiência máxima de regeneração de 34,65% dos explantes, quando inoculados em meio de MS acrescido de 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Taxa de regeneração de 50 a 100% foi observada por Basnayake, Moyle e Birch (2011) a partir de calos de aparência nodular, inoculados em meio de MS.

Dibax et al. (2011) estudando duas variedades brasileiras de cana-de-açúcar (RB931003 e RB98710), verificaram taxas de 70 a 80% na indução de brotos quando na presença de BAP e 60% na presença de BAP e cinetina.

Com relação à frequência de regeneração dos calos no terceiro subcultivo, em meio contendo ANA e BAP, constatou-se que sete variedades mantiveram os bons índices e quatro apresentaram uma queda acentuada quando comparado com os dois subcultivos anteriores.

A variedade RB 83160 destacou-se por apresentar regeneração em 100% dos explantes ao longo de todo experimento. Em oposição, pode-se citar a variedade VAT 90-186 que apresentou uma queda substancial na regeneração em cada subcultivo.

Neste terceiro e último subcultivo, observou-se que a regeneração ocorreu em áreas isoladas do calo e o número de brotos formados caiu drasticamente, uma vez que estes não atingiram o tamanho de 0,5 m para a quantificação (Tabela 2). Estes dados ajudam a confirmar o retardamento do processo regenerativo, a partir do envelhecimento dos calos, uma vez que as condições de cultivo foram as mesmas durante todo o período de cultivo.

De maneira geral, desde a indução dos calos embriogênicos até o terceiro subcultivo em meio de regeneração (Figura 5), observou-se a manutenção na capacidade regenerativa dos calos por 22 semanas de cultivo, para sete das quatorze variedades estudadas, desde que os diferentes tipos de células sejam cultivados em meios de cultura adequados.

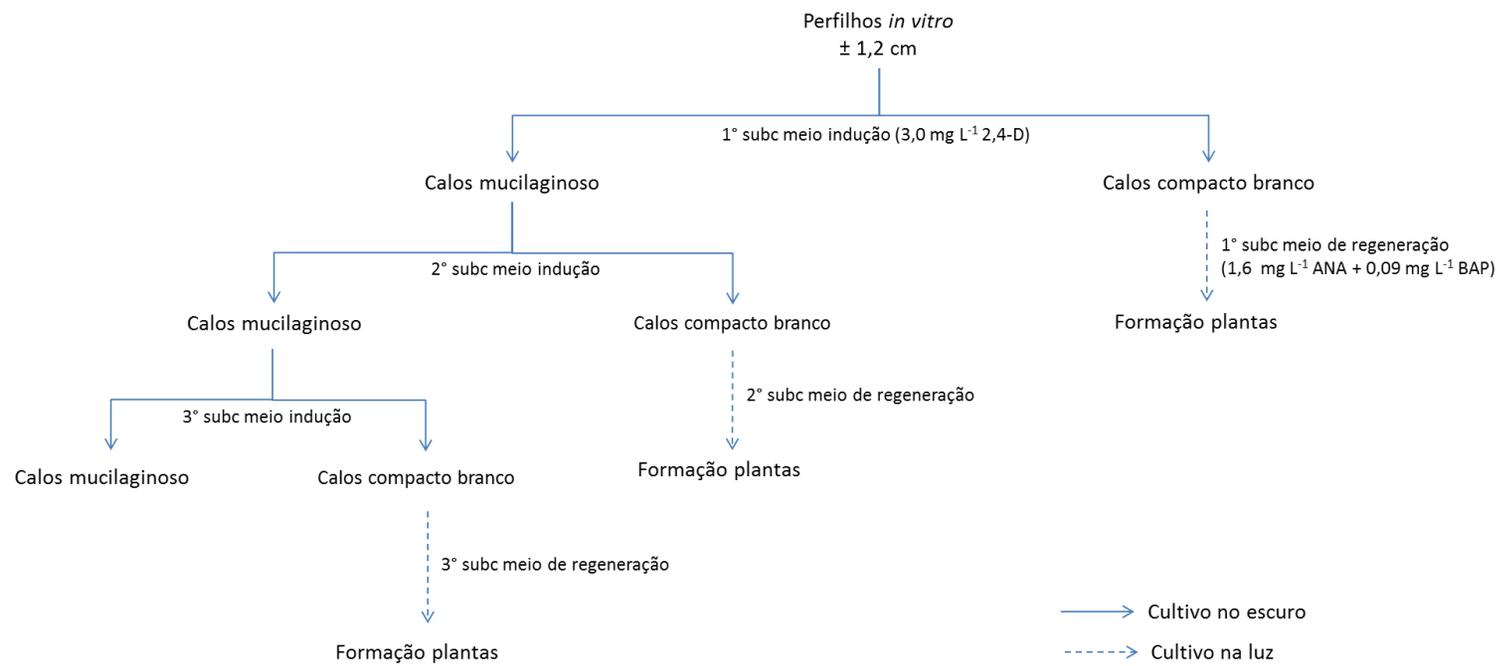


Figura 5 Diagrama esquemático das etapas envolvidas no processo embriogênico da cana-de-açúcar.

Basnayake, Moyle e Birch (2011), através de constantes renovações do meio de cultura de indução contendo 2,4-D, conseguiram obter culturas de cana-de-açúcar predominantemente embriogênicas, durante período de 28 a 42 meses. Entretanto, as variedades diferiram na capacidade regenerativa. Esses autores observaram casos extremos de declínio a partir de poucas semanas de cultivo.

Existem relatos na literatura evidenciando que calos de cana-de-açúcar foram mantidos por mais de 19 meses em meio de cultura modificado, sem perder a habilidade de formar embriões somáticos (CHEN et al., 1988; FITCH; MOORE, 1990; BRISIBE et al., 1994).

Embora a manutenção da capacidade embriogênica e de regeneração dos calos seja importante para a seleção e transformação genética (CHAI et al., 2011), as chances de incidência de variação somaclonal indesejáveis aumentam consideravelmente com o tempo de cultivo (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011).

Neste sentido, trabalhos recentes que visam à transformação genética de cana-de-açúcar têm se preocupado em estabelecer plantas regeneradas a partir de calos embriogênicos em um período relativamente curto (SNYMAN et al., 2006; RAZA et al., 2012), principalmente para evitar as alterações genéticas acumuladas.

De maneira geral, a produção inicial de grande quantidade de clones pode ser obtida a partir da sexta semana da indução, representando uma alternativa potencial para a utilização em estudos de transgenia envolvendo a espécie. Entretanto, o cultivo estendido pode representar uma ferramenta útil para a produção massal de plantas por biorreatores e para a produção de sementes sintéticas visando à criopreservação.

3.3 Análise histológica

O calo mucilaginoso, anatomicamente, apresenta a maioria das células com formato alongado e grandes espaços intercelulares. Contudo, em meio a este aglomerado, existem células meristemáticas contendo citoplasma denso e núcleo volumoso (Figura 6A). Essas células meristemáticas progridem para a formação de massas nodulares constituídas por células pequenas, justapostas e em intensa divisão celular (Figura 6B).

Esta característica de desenvolvimento foi similar para todas as variedades estudadas e estão de acordo com os relatos de Ho e Vasil (1983) e Chen et al. (1988), que desenvolveram os primeiros protocolos de embriogênese somática para cana-de-açúcar. Vale ressaltar, que ao contrário desses autores, o explante aqui utilizado tem origem de plantas *in vitro*.

Já em meio de cultura de regeneração, observou-se na periferia do calo compacto nodular a formação de embriões em fase linear (pró-embrioides), contendo de duas a quatro células. Esses embrioides aparentemente apresentaram-se envoltos por uma camada fina de parede celular (Figura 6C).

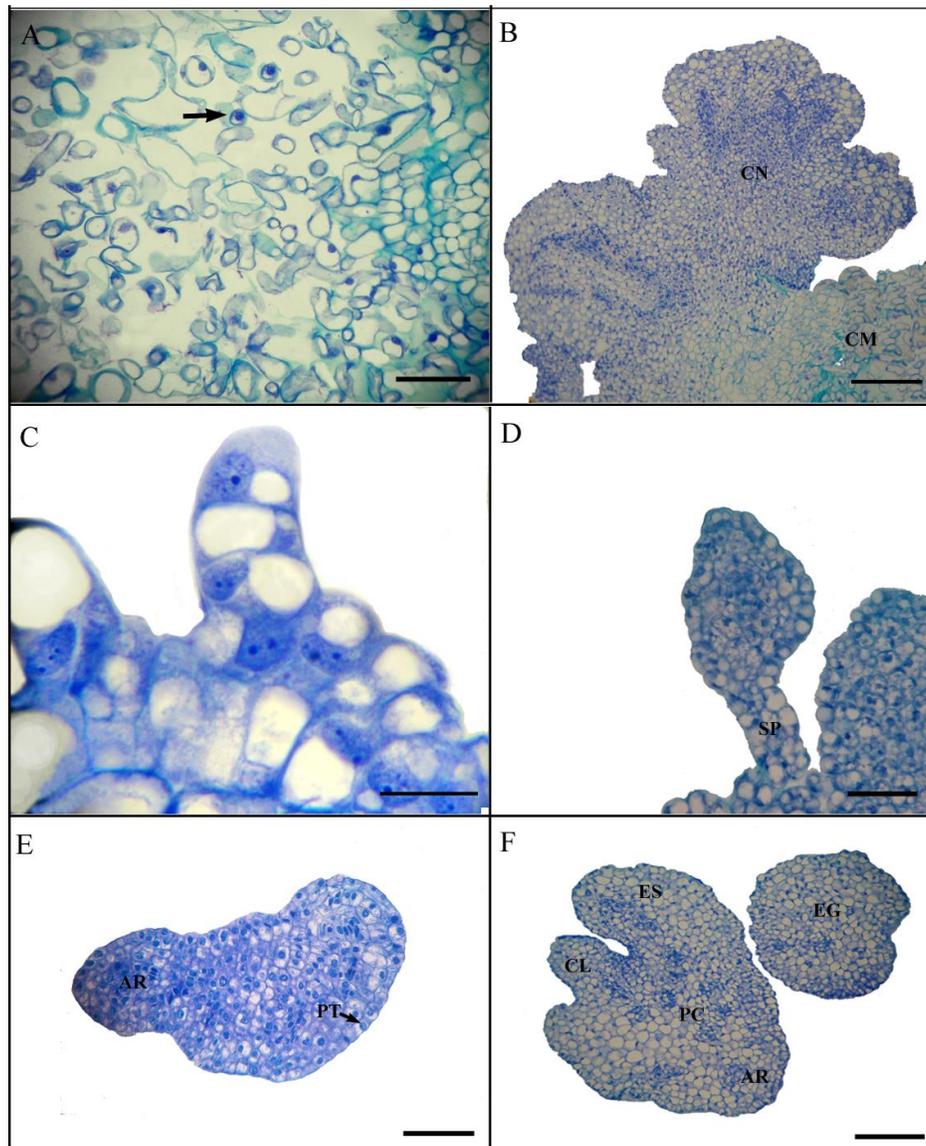


Figura 6, continua...

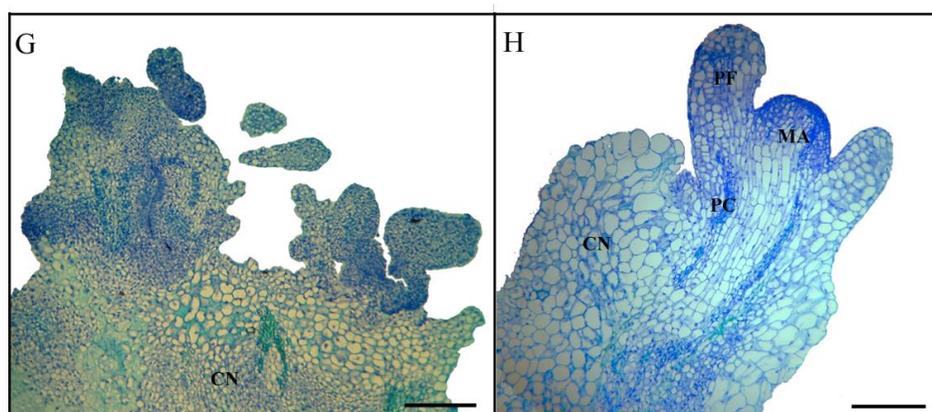


Figura 6 Análise histológica da embriogênese somática de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). A: Aspecto do calo mucilaginoso contendo células meristemáticas (seta); B: Calo nodular (CN) formado sobre o tecido mucilaginoso (CM); C: Pró-embrioides em estágio linear; D: Embrião globular com suspensor (SP); E: Embrião globular apresentando ápice radicular (AR) e protoderme (PT); F: Embrião globular (EG) e cotiledonar contendo escutelo (ES), coleóptilo (CL), procâmbio (PC) e ápice radicular (AR); G: Calo nodular (CN) com embriões em diferentes estádios de desenvolvimento; H: Gema advéncia com meristema apical (MA), primórdios foliares (PF) e procâmbio (PC), formada a partir do calo nodular (CN) (Barras A, D, E e G = 50 μ m; B e F = 100 μ m; C = 10 μ m).

Intensas divisões celulares na região apical dos pró-embrioides deram origem aos embriões em estágio globular. Nesta fase, observou-se na base do embrião globular uma estrutura semelhante a um suspensor, conectando o embrião ao calo compacto nodular (Figura 6D). A presença do suspensor sugere uma origem unicelular dos embriões. Contudo, embriões somáticos de origem multicelular também foram verificados.

Para Sané et al. (2006) a origem unicelular é uma via típica de desenvolvimento da embriogênese, na qual a célula competente encontra-se em ativa divisão dentro de uma camada externa de polissacarídeo, que proporciona

um isolamento físico das células adjacentes. Todavia, a ocorrência simultânea de embriões com origem unicelular e multicelular já foi relatada em outros trabalhos científicos (ALMEIDA et al., 2012; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).

Posteriormente, constatou-se a formação de embriões globulares em fase mais avançada e embriões em fase cotiledonar. Os embriões globulares visualizados apresentaram início de desenvolvimento do ápice radicular e protoderme (Figura 6E). Já os embriões em fase cotiledonar exibiram duas regiões distintas: uma apical contendo o escutelo e formação dos coleótilos e outra basal, onde se localizará o ápice radicular. O início de desenvolvimento de feixes procambiais também foi verificado (Figura 6F).

Em geral, embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento foram observados em um mesmo tecido nodular, caracterizando um processo embriogênico assincronizado (Figura 6G).

Em todas as fases da embriogênese foi possível observar, simultaneamente ao desenvolvimento dos embriões somáticos, a formação de gemas adventícias oriundas dos calos nodulares, evidenciando a ocorrência de organogênese indireta (Figura 6H).

Esses resultados corroboram os de Falco et al. (1996) que reportaram a formação de gemas adventícias com origem unipolar, evidenciadas pela ampla conexão vascular com o tecido de origem, juntamente com a formação de embriões somáticos.

Já Dibax et al. (2013) revelaram que a origem dos brotos regenerados em duas cultivares de cana-de-açúcar (RB 92579 e RB 93509), ocorreu exclusivamente pela via organogênica indireta. De acordo com esses autores, a

regeneração dos calos ocorreu em um período de cultivo relativamente curto para completar a formação dos embriões somáticos.

4 CONCLUSÕES

- Plantas *in vitro* podem ser utilizadas como fonte de material para a indução de calos embriogênicos de cana-de-açúcar. O tamanho do explante inicial de 12 mm é o mais responsivo.
- Das quatorze variedades avaliadas, treze apresentam potencial embriogênico e são capazes de regenerar clones a partir da sexta semana de cultivo.
- As variedades RB 83160, SP 813804, RB 99395, CB 45-3, VAT 90-61, VAT 90-212 e SP 854594 são capazes de manter a capacidade morfogênica dos calos por pelo menos 22 semanas, desde que os diferentes tipos de células sejam cultivados em meios de cultura adequados.
- A regeneração das plantas ocorre simultaneamente pela via embriogênica e organogênica.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. et al. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31; n. 8, p. 1495-515, Aug. 2012.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. van. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation: an international journal on plant growth and development**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 147-173, Mar. 2011.

BASNAYAKE, S. W. V.; MOYLE, R.; BIRCH, R. G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 439–448, Mar. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 5 mar. 2013.

BRISIBE, B. A. et al. Regulation of somatic embryogenesis in long-term callus cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **New Phytologist**, v. 126, n. 2, p. 301-307, Feb. 1994.

CHAI, M. et al. Callus induction, plant regeneration, and long-term maintenance of embryogenic cultures in *Zoysia matrella* [L.] Merr. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 2, p. 187-192, Feb. 2011.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 62-89, Mar. 2011.

CHEN, W. H. et al. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus culture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 39, n. 199, p. 251-261, Feb. 1988.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, Safra 2012/2013.** Brasília, 2012.

DIBAX, R. et al. Plant regeneration of sugarcane cv. RB931003 and RB98710 from somatic embryos and acclimatization. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 32-37, Aug. 2011.

DIBAX, R. et al. Protocol optimization and histological analysis of *in vitro* plant regeneration of 'RB92579' and 'RB93509' sugarcane cultivars. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 1, p. 49-54, jan. 2013.

FALCO, M. C. et al. Histological characterization of *in vitro* regeneration of *Saccharum* sp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 8, n. 2, p. 93-97, 1996.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./dez. 2011.

FITCH, M. M. M.; MOORE, P. H. Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 20, v. 3, p. 157-163, Mar 1990.

GARCIA, R. et al. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type of growth regulator. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 90, n. 2, p. 181-190, Aug 2007.

GUIDERDONI, E.; DEMARLY, Y. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 71-88, 1988.

HO, W. J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, New York, v. 118, n. 3, p. 169-180, 1983.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.

JOYCE, P. et al. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 2, p. 173-183, Feb. 2010.

KHAN, I. A.; KHATRI, A. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: histological studies. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 3, p. 631-636, 2006.

MANICKAVASAGAM, M. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 3, p. 134-143, Sept. 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue o. **Protoplasma**, New York, v. 59, n. 2, p. 368, 1964.

PEZZO, C. R.; DO AMARAL, W. A. N. O papel do Brasil no estabelecimento do mercado internacional de biocombustíveis. **Revista USP**, São Paulo, n. 75, p. 18-31, set./nov. 2007.

POLA, S.; MANI, S.; RAMANA, T. Long-term maintenance of callus cultures from immature embryo of *Sorghum bicolor*. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 4, p. 415-421, 2009.

RAZA, S. et al. Regeneration in sugarcane via somatic embryogenesis and genomic instability in regenerated plants. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 131-136, June 2012.

SANÉ, D. et al. Histochemical analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, n. 2, p. 301–308, 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 3, p. 501-508, 2012.

SEEMA, G. et al. Plantlet regeneration of sugarcane varieties and transient gus expression in calli by electroporation. **Sugar Tech**, v. 3, n. 1/2, p. 27-33, 2001.

SENGAR, R. S.; SENGAR, K.; GARG, S. K. Biotechnological approaches for high sugarcane yield. **Plant Sciences Feed**, v. 1, n. 7, p. 101-111, 2011.

SILVA, R. de C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 111, n. 1, p. 59-67, Oct. 2012.

SINGH, G. et al. *In vitro* induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane. **Euphytica**, Wageningen, v. 160, n. 1, p. 35-47, Mar. 2008.

SNYMAN, S. J. et al. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 2, p. 234-249, May 2011.

SNYMAN, S. J. et al. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 10, p. 1016–1023, Oct. 2006.

TAPARIA, Y.; GALLO, M.; ALTPETER, F. Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for eficiente genetic transformation of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 111, n. 2, p. 131-141, Nov. 2012.

CAPÍTULO 4

**CONSERVAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO *in vitro* DE ÁPICES
CAULINARES DE CANA-DE-AÇÚCAR**

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho avaliar a sobrevivência, a regeneração e a estabilidade genômica de brotos de cana-de-açúcar conservados *in vitro* sob crescimento mínimo, além de verificar a tolerância de ápices caulinares a criopreservação pela técnica *droplet vitrification*. Neste sentido, brotos de dez variedades de cana-de-açúcar foram inoculados em dois meios de crescimento mínimo: MC1 constituído de ½MS e 30 g L⁻¹ de sorbitol e MC2 com formulação similar ao primeiro, porém suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ABA. Os brotos foram mantidos por até 12 meses em temperatura de 18 °C, na presença de luz. Ao final do período, os explantes foram inoculados em meio de multiplicação contendo 0,2 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de cinetina para recuperação do crescimento. Para a criopreservação, ápices caulinares foram extraídos e pré-cultivados em MS contendo 0,3 M de sacarose, por 24 horas. Em seguida, os ápices foram expostos a *loading solution* por 20 minutos, pela solução de vitrificação (PVS 2) por 20 e 30 minutos à 0 °C e, posteriormente, mergulhados diretamente em nitrogênio líquido (NL). O descongelamento foi rápido em solução concentrada de sacarose. Como resultados, verificou-se comportamento distinto das variedades estudadas ao longo do tempo de armazenamento, mas de modo geral, o MC1 foi o que proporcionou as maiores taxas de sobrevivência dos explantes. A recuperação do crescimento foi rápida e a capacidade de multiplicação recuperada a partir do segundo subcultivo. Todavia, por meio da citometria de fluxo, observou-se uma redução na quantidade relativa de DNA estimada aos doze meses de conservação, para a maioria das variedades analisadas, evento não observado quando o monitoramento foi feito aos 6 meses. Para a criopreservação, constatou-se taxas de sobrevivência de 20 e 10% dos explantes, quando antes do congelamento, estes foram desidratados por 20 e 30 minutos em PVS 2, respectivamente. A sobrevivência dos ápices demonstra a possibilidade de se criopreservar germoplasma da espécie a partir de estudos adicionais e otimização de etapas da técnica.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Conservação *in vitro*. Citometria de fluxo. Variação Somaclonal.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the survival, regeneration, recovery and genomic stability of sugarcane shoots preserved *in vitro* under minimal growth, in addition to verifying the tolerance of shoot tips to cryopreservation using the dropletvitrification technique. For this, shoots ten sugarcane varieties were inoculated in two minimal growth media: CM1 consisting of ½ MS and 30 g L⁻¹ sorbitol and CM2 with formulation similar to the first, but supplemented with 1.0 mg L⁻¹ of ABA . The shoots were maintained for 12 months at 18 °C in the presence of light. At the end of this period the explants were inoculated in multiplication medium containing 0.2 mg L⁻¹ BAP and 0.1 mg L⁻¹ kinetin for growth recovery. For cryopreservation, shoot tips were extracted and precultured on MS containing 0.3 M sucrose for 24 hours. Subsequently, the apices were exposed to a loading solution for 20 minutes, to the vitrification solution (PVS 2) for 20 and 30 minutes at 0° C and immersed directly into liquid nitrogen (LN). The thawing was fast in concentrated sucrose solution. As a result, we found distinct behavior of the varieties studied during the storage time but in general, the CM1 provided the highest explant survival rates. Growth recovery was rapid and multiplication capability was recuperated starting from the second subculture. However, via flow cytometry, we observed a decrease in the relative amount of DNA estimated at twelve months of storage, for most varieties analyzed, a fact not observed at 6 months. For cryopreservation, we found a survival rate of 20% and 10% of explants when prior to freezing the apices were dehydrated for 20 to 30 minutes in PVS 2, respectively. The survival of apices demonstrates the possibility of cryopreservation of species germplasm starting from further studies and optimization of the steps of the technique.

Keywords: *Saccharum* spp. *In vitro* Conservation. Flow cytometry. Somaclonal variation.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma espécie de grande importância para o agronegócio brasileiro e sua demanda tende a aumentar ainda mais devido à combinação de fatores extremamente favoráveis, incluindo perspectivas no crescimento dos mercados interno e externo, aumento do preço do petróleo e preocupação universal na produção de energia sustentável (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Para atender às demandas atuais da cultura, as diferentes técnicas da cultura de tecidos podem ser uma importante aliada, seja para o desenvolvimento mais rápido de novas cultivares, seja para auxiliar programas de melhoramento genético da cultura, ou então, para acelerar a distribuição de materiais promissores, ou mesmo, conservar a variabilidade genética da espécie. Até o momento, a conservação de germoplasma de cana-de-açúcar é feita a partir de coleções em bancos de germoplasma mantidos em campo (ROACH, 1995; LEMOS et al., 2002).

De acordo com Engelmann (2011), as técnicas *in vitro* são muito úteis para a conservação de recursos genéticos das plantas, principalmente para espécies com sementes recalcitrantes e propagação vegetativa, raras e ameaçadas de extinção, assim como genótipos elite ou geneticamente modificados. Além disso, existem diferentes métodos de conservação *in vitro* que podem ser utilizados.

O método de crescimento mínimo tem sido utilizado com sucesso para a conservação a curto e médio prazo, principalmente de meristemas e/ou ápices caulinares de muitas espécies, e consiste na redução do crescimento e no

aumento dos intervalos entre os subcultivos, sem afetar significativamente a viabilidade dos explantes (ENGELMANN, 2011).

Essa redução das atividades metabólicas geralmente é alcançada pela modificação do ambiente físico e/ou da composição do meio de cultura (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010). As abordagens amplamente utilizadas envolvem principalmente a redução da temperatura de cultivo e adição de compostos osmoticamente ativos no meio de cultura, como a sacarose, o sorbitol e o manitol (MARINO et al., 2010). Muitas vezes, inibidores do crescimento, como por exemplo, o ácido abscísico, também são utilizados (RAI et al., 2011).

Outra modalidade envolve a conservação em temperatura ultrabaixa em nitrogênio líquido (-196 °C) e, atualmente, é o único método com potencialidade para conservação em longo prazo de germoplasma vegetal. Sob temperatura ultrabaixa as divisões celulares e os processos metabólicos são drasticamente reduzidos permitindo, assim, que o material fique armazenado por um período de tempo teoricamente ilimitado (ENGELMANN, 2004).

O maior desafio para os protocolos de criopreservação é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células, que de maneira geral, podem gerar uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos aos tecidos (CARVALHO, 2007). Para minimizar estes problemas, diversas técnicas já foram desenvolvidas, o que permitiu um aumento acentuado no número de espécies criopreservadas nos últimos anos (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

No caso da cana-de açúcar, protocolos de criopreservação já foram desenvolvidos para calos embriogênicos (MARTINEZ-MONTERO et al.,

1998), embriões somáticos (MARTINEZ-MONTERO; MARTINEZ; ENGELMANN, 2008) suspensões celulares (GNANAPRAGASAM; VASIL, 1990) e ápice caulinar (GONZALEZ-ARNAO, 1993). As técnicas utilizadas nestes trabalhos foram variadas e os resultados genótipo dependentes.

Recentemente, uma nova técnica de criopreservação denominada de *droplet vitrification* foi desenvolvida (PANIS, PIETTE; SWENNEN, 2005), a qual combina a aplicação das soluções de vitrificação altamente concentradas com uma taxa de congelamento e descongelamento ultrarrápido (PANIS et al., 2011).

Os passos basicamente envolvem a desidratação osmótica dos explantes e o congelamento dos propágulos alvo em uma microgota de solução de vitrificação (PVS 2 ou PVS 3) colocada sobre uma tira de papel alumínio, na qual é imersa diretamente em nitrogênio líquido. O descongelamento é conduzido em meio líquido com alta concentração de sacarose, à temperatura ambiente (PANIS, PIETTE; SWENNEN, 2005).

O pequeno volume de crioprotetor (10 a 15 μL) é que caracteriza o principal interesse da técnica em atingir um estado vitrificado extremamente rápido durante o congelamento e evitar a devitrificação durante o descongelamento (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Esses são requerimentos essenciais para evitar os danos letais causados pela formação dos cristais de gelo intracelular.

Para a cana-de-açúcar apenas um relato foi encontrado na literatura envolvendo a criopreservação de ápices por meio deste método (BARRACO; SYLVESTRE; ENGELMANN, 2011). Entretanto, de acordo com estes autores, estudos adicionais necessitam ser realizados a fim de otimizar o protocolo para a

espécie e aumentar a taxa de regeneração, média de 28%. Atualmente, no Brasil, nenhum relato de sucesso envolvendo a espécie foi encontrado.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar a sobrevivência, a recuperação do crescimento e a estabilidade genômica de variedades brasileiras de cana-de-açúcar à conservação por crescimento mínimo, além de verificar a tolerância de ápices caulinares a temperatura ultrabaixa do nitrogênio líquido (-196 °C), por meio da técnica *droplet vitrification*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar por crescimento mínimo

Ápices caulinares de variedades brasileiras de cana-de-açúcar foram coletados no Banco de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo – AL, e enviados para o Laboratório de Cultura de Tecidos II da Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília-DF, onde os experimentos foram realizados.

Inicialmente, os ápices foram desinfestados com álcool 70%, hiplorito de sódio 2,5%, lavados em água destilada autoclavada, seccionados transversalmente (± 3 mm) e inoculados em meio de cultura contendo sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético (ANA) e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina (KIN) e solidificado com $2,3 \text{ g L}^{-1}$ de *Phytigel*® (SIGMA), conforme protocolo estabelecido por Gill, Malhotra e Gosal (2006).

Passados 40 dias de cultivo em condições de luminosidade, os brotos regenerados foram transferidos para frascos (250 mL) contendo 30 mL de meio de MS adicionado de 30 g L^{-1} de sacarose, $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina (KIN), $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) e solidificado com $2,3 \text{ g L}^{-1}$ de *Phytigel* para multiplicação e melhor desenvolvimento dos brotos.

Dez variedades oriundas da regeneração desses ápices caulinares por organogênese foram selecionadas como fonte de explante para a conservação *in vitro* e verificação da tolerância dos brotos de cana-de-açúcar às condições de

crescimento mínimo, como segue: SP 784764, SP 716949, SP 854594, SP 701143, RB 845210, RB 99395, RB 83160, RB 863129, VAT 90-212 e VAT 90-186.

Duas formulações de meios de cultura foram utilizadas para este experimento, as quais foram baseadas em resultados prévios obtidos. O primeiro meio, denominado MC1, foi constituído de metade das concentrações salinas de MS acrescido de 30 g L⁻¹ de sorbitol e solidificado com 2,3 g L⁻¹ de *Phytigel*. O segundo meio (MC2) utilizado foi similar ao primeiro, porém, suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ácido abscísico (ABA).

O pH dos meios de cultura foi ajustado a 5,8±0,1 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos. Após a esterilização do meio de cultura, o ABA foi adicionado por microfiltração, usando filtro tipo Millipore® (0,22 µm).

Após a inoculação em capela de fluxo laminar, os brotos foram mantidos por 12 meses em câmara vertical do tipo B.O.D. à temperatura de 18 °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiação de 30 µmol.m⁻².s⁻¹. Nenhuma renovação do meio de cultura foi realizada durante o período de armazenamento.

Como repetição, utilizaram-se dez tubos de ensaio (25 x 150 mm) por variedade dentro de cada tratamento: presença e ausência de ABA. Cada tubo de ensaio foi preenchido com 10 mL de meio de cultura e recebeu um broto com comprimento inicial de 1,5 cm.

A avaliação da sobrevivência foi realizada a cada 3 meses de armazenamento, enquanto que, o comprimento, o número de brotos e raízes formados foram avaliados somente ao final do experimento. Ressalta-se que a sobrevivência dos brotos durante o período de conservação *in vitro* foi avaliada visualmente de acordo com o aspecto morfológico e a coloração dos brotos.

Após a coleta dos dados referentes à sobrevivência, estes foram analisados seguindo um esquema de parcelas subdivididas no tempo e comparados por meio de regressão polinomial pelo programa estatístico Sisvar® (FERREIRA, 2011). Já as demais variáveis foram avaliadas segundo um esquema fatorial 10 x 2 (dez variedades x dois meios de cultura). Os dados em percentagem foram previamente transformados por arco-seno com intuito de atender os pressupostos necessários para a análise e a comparação entre as médias foi feita pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

2.1.1 Recuperação do crescimento

Ao final do período de 12 meses de conservação *in vitro*, as plantas foram retiradas do meio de crescimento mínimo e inoculadas em meio de multiplicação para a recuperação do crescimento e verificação da estabilidade genômica por citometria de fluxo.

O meio de multiplicação consistiu de sais e vitaminas de MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,10 mg L⁻¹ de KIN e 0,20 mg L⁻¹ de BAP e solidificado com 2,3 g L⁻¹ de *Phytigel*. Após a transferência, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na presença de luz, à temperatura de 25±2 °C e fotoperíodo de 16 horas.

A sobrevivência, a taxa de multiplicação e o comprimento da maior brotação foram avaliados após 30 dias de cultivo neste meio. Em seguida, as brotações foram novamente transferidas de meio, a fim de verificar o comportamento destas num segundo subcultivo consecutivo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, formando um esquema fatorial 10 x 2 para variedades e meios de cultura. Os dados coletados foram analisados pelo programa estatístico Sisvar e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

2.1.2 Análise da estabilidade genômica por citometria de fluxo

As amostras coletadas ao 0 (controle), 6 e 12 meses de armazenamento *in vitro*, foram mantidas em meio de cultura e conduzidas para o Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras para a determinação da estabilidade genômica por meio da citometria de fluxo.

Durante a preparação das amostras foram utilizadas aproximadamente 20-30 mg de folhas jovens das brotações, e do padrão de referência externo - tomateiro (*Lycopersicon esculentum*L.). Os tecidos foram triturados em placa de *Petri* (10 x 90 mm) contendo 1 mL de tampão de extração resfriado para a liberação dos núcleos (DOLEZEL; DOLEZELOVA; NOVAK, 1994). O tampão utilizado para as análises foi o Marie (MARIE; BROWN, 1993), composto 50 mM glicose, 15 mM NaCl, 15 mM KCl, 5 mM Na₂.EDTA, 50 mM citrato de sódio, 0.5% Tween 20, 50 mM HEPES (pH 7.2) e 1% (m/v) polyvinylpyrrolidone-10 (PVP-10).

Após o processo de extração, a suspensão de núcleos foi aspirada com auxílio de pipeta *Pasteur* e filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de uma solução de 1 mg/mL de Iodeto de Propídeo.

O conteúdo de DNA nuclear em (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a fórmula a seguir:

$$\text{DNA amostra} = \left[\frac{\text{G1 amostra}}{\text{G1 padrão}} \right] \times \text{DNA padrão}$$

As análises foram realizadas no citômetro FacsCalibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA) e os histogramas gerados analisados estatisticamente no *software* WinMDI 2.8.

O delineamento foi o inteiramente casualizado e, para cada tempo analisado, utilizaram-se quatro plantas por variedade e duas leituras no citômetro. Os conteúdos de DNA (pg) obtidos foram submetidos a análises de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade no programa estatístico Sisvar.

2.2 Criopreservação de ápices caulinares de cana-de-açúcar pela técnica *Droplet vitrification*

Plantas de cana-de-açúcar da variedade SP 716949 já estabelecidas *in vitro* e sem nenhum tipo de contaminação por micro-organismos foram utilizadas como fonte de explantes para este experimento.

Para a criopreservação por *droplet vitrification*, ápices caulinares de aproximadamente 1 a 2 mm de tamanho foram extraídos com auxílio da lupa estereoscópica e pré-cultivados em meio de cultura de MS acrescido com 0,3 M de sacarose, onde permaneceram por 24 horas no escuro.

Transcorrido este tempo, os ápices foram expostos a *loading solution* contendo 2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose, por um período de 20 minutos à temperatura ambiente, conforme descrito por Panis, Piette e Swennen, 2005.

Logo em seguida, a *loading solution* foi substituída pela solução resfriada de vitrificação, PVS 2 (*Plant Vitrification solution two*). Esta solução de vitrificação consistiu de 30% (3,26 M) glicerol, 15% (2,42 M) etileno glicol (EG) e 15% (1,9 M) DMSO (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990). A exposição dos ápices à solução de PVS 2 ocorreu por 20 e 30 minutos, à temperatura de 0 °C.

Cinco minutos antes do término do tratamento de desidratação, os ápices foram transferidos para uma tira de papel alumínio resfriada por gelo, contendo uma gota de aproximadamente 10 µL de solução de vitrificação.

Com auxílio de uma pinça, as tiras de papel alumínio resfriadas e contendo os ápices foram rapidamente mergulhadas em nitrogênio líquido (NL) onde permaneceram por aproximadamente 40 minutos.

O descongelamento dos ápices foi rápido, realizado por meio do mergulho das folhas de alumínio em uma solução de recuperação (*unloading solution*) contendo 1,2 M de sacarose, por um período de 15 minutos em temperatura ambiente (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005).

Ressalta-se que a *loading solution*, a solução de vitrificação (PVS 2) e a de recuperação foram dissolvidas em meio de MS com pH ajustado para 5,8 e esterilizadas em filtro Millipore 0,22 µM anteriormente a sua utilização.

Ao final de todo o processo de desidratação, congelamento e descongelamento, os ápices foram transferidos para meio de MS semissólido contendo 3,0 M de sacarose, onde permaneceram por 24 horas.

A regeneração ocorreu em tubos de ensaio contendo meio de multiplicação MS acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,10 mg L⁻¹ de KIN e 0,20 mg L⁻¹ de BAP e geleificado com 2,3 g L⁻¹ de *Phytigel*.

Para fins de comparação, ápices caulinares foram extraídos e inoculados diretamente em meio de multiplicação descrito anteriormente, enquanto outros foram submetidos aos mesmos procedimentos de pré-tratamento e desidratação, porém não foram expostos à temperatura de -196 °C, fornecida pelo nitrogênio líquido.

Neste experimento, o delineamento foi inteiramente casualizado e utilizou-se 10 repetições por tratamento, cada qual contendo um ápice caulinar de cana-de-açúcar. A percentagem de regeneração foi avaliada após quarenta dias em meio de cultivo e os dados observados submetidos à análise de variância por meio do programa estatístico Sisvar. Os dados de percentagem foram transformados por arco-seno a fim de atender os pressupostos necessários para a realização da análise estatística.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar por crescimento mínimo e recuperação do crescimento

Para a conservação da cana-de-açúcar, observou-se que a modificação do meio de cultura, associado com a redução da temperatura de cultivo apresentou efeito significativo no crescimento das plantas *in vitro* e, conseqüentemente, no tempo necessário entre os subcultivos.

De maneira geral, o meio de cultura desprovido de ácido abscísico (ABA) (MC1) proporcionou maiores taxas de sobrevivência dos explantes durante os doze meses de conservação, quando comparado ao meio de cultura com a presença de ABA (MC2). Contudo, pode-se verificar comportamento distinto das variedades estudadas ao longo do tempo de armazenamento (Figura 1).

A variedade SP 784764 foi a que melhor respondeu aos tratamentos aplicados para a conservação, pois aos 12 meses de armazenamento, constatou-se um nível de 85 e 100% de sobrevivência, quando os explantes foram cultivados na presença e ausência de ABA, respectivamente (Figura 1). Durante todo o período, verificou-se um amarelecimento das folhas mais velhas, mas aparentemente, nenhum dano fisiológico foi causado.

As variedades RB 83160, RB 863129, VAT 90-186 e VAT 90-212 apresentaram um comportamento semelhante com relação à porcentagem de sobrevivência dos brotos em resposta aos meios de cultura utilizados para o crescimento mínimo. No MC1, os brotos se mantiveram viáveis por doze meses,

sem a necessidade de subcultivos. Já na presença de ABA, verificou-se uma tendência linear decrescente na sobrevivência destes, mais acentuada para a variedade RB 863129 (Figura 1).

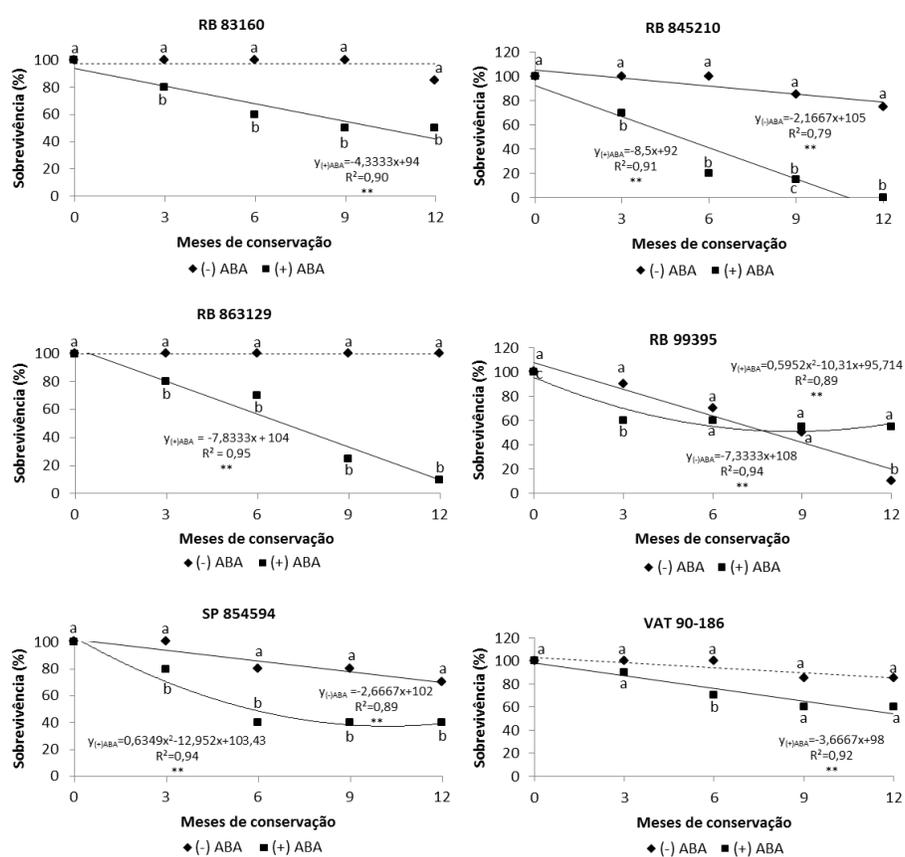


Figura 1, continua...

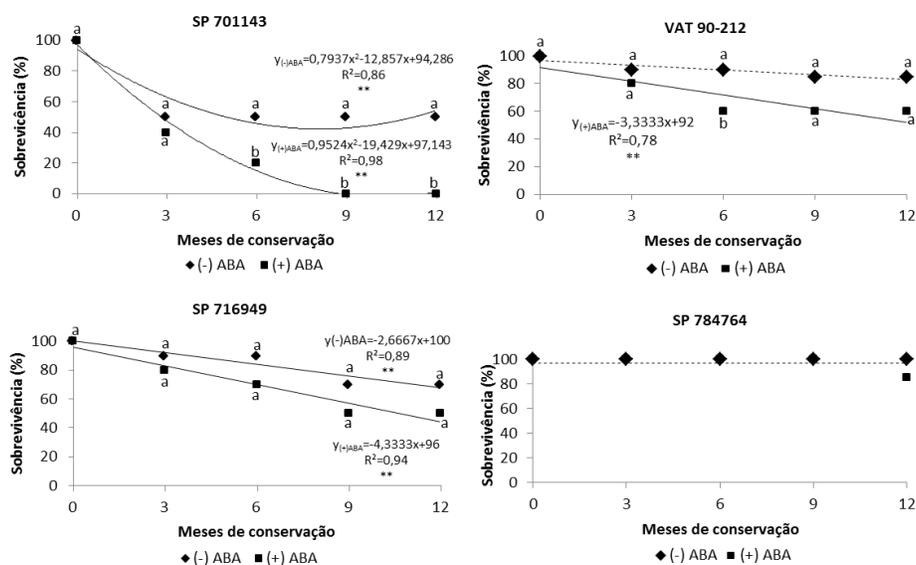


Figura 1 Comportamento das variedades brasileiras de cana-de-açúcar durante os doze meses de conservação *in vitro*, na presença ou ausência de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ABA. *Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada mês de avaliação, pertencem a um mesmo grupo e não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos pelo Teste de Scott-Knott ($p > 0,05$). ** Significativo pelo Teste de Regressão.

Observou-se que duas variedades (SP 701143 e RB 99395) foram mais sensíveis à condição de armazenamento adotada neste trabalho, uma vez que a sobrevivência dos brotos diminuiu significativamente nos primeiros meses de incubação, principalmente, quando conservados na presença de ABA. Ao final dos doze meses, observou-se a sobrevivência de apenas 10% dos brotos da variedade RB 99395 quando em meio de cultura desprovido de ABA e nenhum viável da variedade SP 701143 em meio com ABA (Figura 1).

As variedades RB 845210, SP 854594 e SP 716949 apresentaram uma tendência decrescente na viabilidade dos brotos ao longo do armazenamento em meio de crescimento mínimo. Para a RB 845210, constatou-se que a manutenção dos explantes em MC2 por um período superior a 6 meses foi prejudicial para a sobrevivência dos mesmos (Figura 1).

De acordo com Naidu e Sreenath (1999), os protocolos de conservação *in vitro* devem refletir a taxa de sobrevivência máxima com um mínimo de subcultivos. Neste trabalho, a maioria das variedades em meio de cultura na presença de ABA (MC2) apresentaram taxas de sobrevivência abaixo de 60%, sugerindo que este meio não é propício para a manutenção de brotação de cana-de-açúcar.

A aplicação exógena do ácido abscísico é capaz de aprimorar as respostas adaptativas das plantas e tecidos aos vários tipos de estresse causados pelo ambiente *in vitro* (RAI et al., 2011). Entretanto, deve ser utilizado em concentrações apropriadas para o retardamento do crescimento sem, contudo, causar efeitos inibitórios na sobrevivência dos explantes (CID; CARVALHO, 2008; SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011).

Silva e Scherwinski-Pereira (2011) constataram um decréscimo relativo na sobrevivência, no comprimento dos brotos e no número de gemas com o aumento da concentração de ABA no meio de conservação de duas espécies de *Piper*.

Enquanto que para a conservação de *Manihot esculenta*, Cid e Carvalho (2008) verificaram que o ABA induziu à dormência das gemas e atrasou a brotação, sem afetar o crescimento posterior das plantas.

Estudos prévios com cana-de-açúcar relataram a tolerância dos brotos à conservação *in vitro* por meio de modificações na composição do meio de cultura e temperatura de incubação (LEMOS et al., 2002; SARWAR; SIDDIQUI, 2004). Contudo, os resultados descritos por estes autores são bem diferenciados com os encontrados para as variedades brasileiras de cana-de-açúcar aqui estudadas.

Lemos et al. (2002) demonstraram que brotos de cana-de-açúcar permaneceram viáveis após um ano no mesmo meio de cultura quando o inibidor de crescimento, ABA, na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi utilizado em associação com 20 g L^{-1} de sacarose e temperatura reduzida (15° C).

De maneira geral, a utilização de ABA em meios de cultura tem sido relatada em diversos trabalhos que visam a conservação de germoplasma de espécies vegetais a curto e médio prazo (WATT et al., 2000; GOPAL; CHAMAIL; SARKAR, 2004) e a longo prazo por meio das técnicas de criopreservação (DANSO; FORD-LLYOD, 2008; POPOVA et al., 2009). Todavia, as respostas são distintas, variando de espécie para espécie.

Neste trabalho, possivelmente, a combinação do açúcar álcool (sorbitol) com o inibidor de crescimento e a temperatura reduzida a 18° C foi excessiva na restrição do crescimento dos brotos para a maioria das variedades estudadas.

Ao contrário do observado no meio MC2, níveis satisfatórios de sobrevivência dos brotos de cana-de-açúcar (aproximadamente 80%) foram observados quando o armazenamento ocorreu no MC1, somente com a combinação do regulador osmótico e da temperatura reduzida (18° C). Nesta condição, os explantes puderam ser mantidos por doze meses consecutivos *in vitro*, sem a necessidade de renovação do meio de cultura.

Para Marino et al. (2010) os efeitos do sorbitol dependem da ação conjunta com a temperatura, mas também com o estado fisiológico dos explantes.

Brotos de *Pinus* conservados em meio de crescimento mínimo contendo sorbitol apresentaram baixa percentagem de sobrevivência e crescimento quando comparado com tratamentos contendo sacarose e sacarose + manitol (MARINO et al., 2010). De acordo com esses autores, a maior atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) indicaram um elevado grau de estresse oxidativo dos brotos armazenados na presença deste carboidrato.

A adição de sacarose combinada com as diferentes concentrações de sorbitol promoveu elevada percentagem de abscisão foliar para *Hancornia speciosa* (SANTOS et al., 2011). Este problema foi contornado por Sá, Léo e Silva Léo (2011) quando utilizaram altas concentrações de manitol, embora tenha sido evidenciado efeito nocivo deste carboidrato ao explante.

Para a conservação de germoplasma *in vitro* de *Podophyllum* sp. a adição de osmóticos sorbitol e manitol (2%) no meio de cultura aumentou a taxa de sobrevivência dos brotos, embora se tenha observado uma deterioração com relação à qualidade de crescimento dos explantes como, por exemplo, aparecimento de sinais de clorose (LATA et al., 2010).

Os resultados referentes a comprimento, formação de raízes e formação de brotos secundários podem ser observados na Tabela 1. Diante das condições aqui fornecidas às variedades de cana-de-açúcar, um maior crescimento dos brotos foi constatado para aqueles conservados na ausência de ABA (MC1). Na primeira avaliação, aos três meses de armazenamento, verificou-se o desenvolvimento dos brotos com aumento do comprimento, emissão de novas

folhas e também de novos brotos. Contudo, ao longo do período de conservação, o crescimento cessou e, em alguns casos, as folhas mais antigas tornaram-se amareladas e necrosadas.

Já os explantes mantidos em MC2, ou seja, na presença de ABA, apresentaram maior restrição no crescimento, uma vez que praticamente mantiveram o tamanho inicial dos brotos com 1,5 cm. De maneira geral, o comportamento dos brotos no meio MC2 foi similar para todas as variedades, não sendo observadas diferenças estatísticas nas variáveis analisadas (Tabela 1).

Tabela 1 Comprimento de brotações (cm), número de raízes e brotos secundários (sec) formados em variedades de cana-de-açúcar durante o armazenamento *in vitro* em meio de cultura suplementado ou não com ácido abscísico na concentração de 1,0 mg L⁻¹. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 2013.

Variedade	Comprimento		Nº de raízes		Nº brotos sec	
	(-) ABA	(+) ABA	(-) ABA	(+) ABA	(-) ABA	(+) ABA
SP 701143	1,8 cA*	-**	3,4 bA	-	0,8 aA	-
RB 99395	1,5 cA	1,6 aA	1,2 bA	3,1 aB	0,0 bA	0,1 aA
RB 845210	3,7 aA	-	12,0 aA	-	0,1 bA	-
SP 854594	2,5 bA	1,7 aA	6,8 bA	3,3 aA	1,2 aA	0,0 aB
VAT90-212	2,5 bA	1,6 aB	12,0 aA	3,9 aB	0,8 aA	0,6 aA
SP 716949	2,7 bA	1,6 aB	8,9 aA	9,0 aA	0,7 aA	0,6 aA
RB 863129	2,5 bA	1,5 aB	4,9 bA	2,8 aB	0,5 bA	0,0 aA
RB 83160	2,8 bA	1,6 aB	3,3 bA	3,1 aA	0,3 bA	0,2 aA
VAT90-186	2,2 bA	1,5 aB	4,8 bA	3,1 aA	0,6 aA	0,1 aA
SP 784764	3,4 aA	1,5 aB	7,9 aA	5,1 aA	0,2 bA	0,2 aA

* Médias seguidas por letra minúsculas iguais na coluna, pertencem ao mesmo grupo e não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas distintas dentro de cada variável diferem entre si, pelo Teste de F. ** Brotos mortos.

A preservação de materiais vegetais *in vitro* depende do genótipo, do tipo de explante, da composição do meio de cultura, das condições ambientais e período de armazenamento. De modo geral, o meio com baixa disponibilidade de nutrientes permite aos explantes reduzirem as taxas de crescimento. Entretanto, a manutenção destes por longos períodos pode acarretar o esgotamento dos nutrientes, levando ao aparecimento de sintomas de deficiências e/ou afetando a sobrevivência dos mesmos (AHMED; ANJUM, 2010).

Para conservação de *Pyrus* sp. a redução de sais do meio proporcionou as melhores taxas de sobrevivência e regeneração, por um período de seis meses, sendo que após esse tempo, foi observada a morte das brotações devido a escassez de nutrientes no meio de cultivo (AHMED; ANJUM, 2010). Para Lata et al. (2010), a combinação de vários fatores incluindo contaminação, dessecação e diminuição dos nutrientes do meio de cultura foi prejudicial para a sobrevivência de *Podophyllum peltatum* durante o armazenamento.

Neste trabalho, apesar do amarelecimento das folhas mais antigas ao longo do período de conservação em MC1, não se observou danos fisiológicos aos explantes e/ou diminuição da viabilidade, fato este comprovado pela recuperação do crescimento.

Após um ano de conservação em condições de crescimento mínimo, brotos transferidos para meio de multiplicação contendo os reguladores BAP e cinetina, apresentaram rápida recuperação dos explantes através da emissão de novas folhas, crescimento da parte aérea e desenvolvimento de novos brotos. Ressalta-se que os brotos avaliados visualmente como viáveis através de aspectos morfológicos, recuperaram o crescimento nesta etapa (Figura 1A-D).

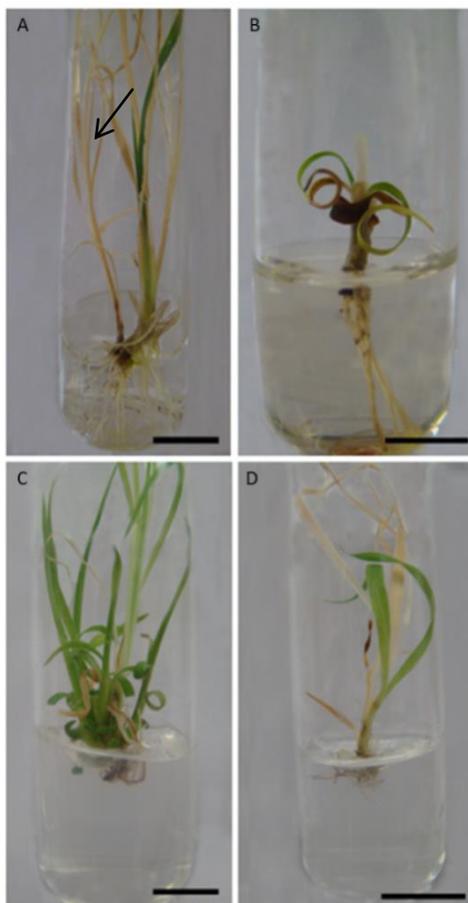


Figura 1 Aspecto visual das brotações de cana-de-açúcar conservadas por dozes meses *in vitro* e após a recuperação do crescimento. A: Broto conservado em meio $\frac{1}{2}$ MS adicionado de 30 g L^{-1} de sorbitol (MC1). A seta indica o amarelecimento das folhas mais antigas; B: Broto conservado em meio $\frac{1}{2}$ MS adicionado de sorbitol e ABA (MC2); C: Recuperação do crescimento do broto oriundo do MC1, após trinta dias em meio de multiplicação; D: Recuperação do crescimento do broto oriundo do MC2. (Barras = 1,0 cm).

De maneira geral foi possível constatar o efeito dos tratamentos aplicados durante a conservação nesta fase de reativação do crescimento. Considerando as plantas oriundas do MC1, pode-se verificar que as dez variedades não apresentaram diferença significativa entre si com relação à produção de novos brotos, nos dois subcultivos consecutivos realizados.

Conforme resultados apresentados na Tabela 2, a proliferação dos brotos secundários foi significativamente superior no segundo subcultivo. Esses resultados demonstram uma necessidade de recuperação fisiológica dos explantes, anteriormente à retomada do potencial de multiplicação.

Resultados similares foram encontrados por Marino et al. (2010) na conservação de brotos de *Pinus*. Esses autores verificaram que a maior proliferação de brotos ocorreu no segundo subcultivo consecutivo e que o tratamento de origem também influenciou nos resultados. Enquanto Silva, Luis e Scherwinski-Pereira (2012) notaram diferenças na recuperação dos genótipos de *Vitis* em termos de número de brotos e gemas em vários subcultivos analisados.

A reativação do crescimento dos explantes de cana-de-açúcar oriundos do MC2 foi influenciada pelo genótipo. Com relação à produção de novos brotos, observou-se uma superioridade da variedade SP 716949 quando comparada com as demais, com média de 4,8 e 10,0 brotos por explante no primeiro e no segundo subcultivo, respectivamente. Já a variedade RB 83160 apresentou um aumento significativo na produção de novos brotos no segundo subcultivo (Tabela 2). As demais variedades apresentaram uma baixa capacidade de produção de brotos secundários, após o período de conservação.

Tabela 2 Recuperação do crescimento, seguido por 2 subcultivos consecutivos, das variedades brasileiras de cana-de-açúcar, após 12 meses de conservação *in vitro* em meio de cultura contendo ou não a presença de ABA. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 2013.

Variedade	Nº Brotos				Comprimento			
	(-) ABA		(+) ABA		(-) ABA		(+) ABA	
	Subc. 1	Subc. 2	Subc. 1	Subc. 2	Subc. 1	Subc. 2	Subc. 1	Subc. 2
SP 701143	1,5 aB	9,0 aA	-**	-	3,5 aA	2,9 aA	-	-
RB 99395	-	-	1,5 bB	12,0 aA	-	-	2,0 aB	3,0 aA
RB 845210	1,5 aB	6,8 aA	-	-	2,7 aB	3,7 aA	-	-
SP 854594	0,8 aA	3,0 aA	0,0 bA	1,0 bA	2,2 aA	2,0 bA	1,9 aB	3,0 aA
VAT 90-212	1,7 aB	7,0 aA	0,4 bA	1,5 bA	3,1 aA	3,3 aA	2,0 aA	1,9 bA
SP 716949	2,0 aB	9,6 aA	4,8 aB	10,0 aA	2,7 aB	3,4 aA	2,6 aB	3,4 aA
RB 863129	1,7 aB	7,5 aA	-	-	2,2 aB	3,6 aA	-	-
RB 83160	0,3 aB	5,2 aA	0,0 bA	1,0 bA	2,1 aB	3,6 aA	1,7 aA	2,0 bA
VAT 90-186	1,7 aB	8,4 aA	0,5 bA	3,2 bA	2,6 aB	3,4 aA	2,1 aB	3,2 aA
SP 784764	1,6 aB	4,4 aA	0,7 bA	3,0 bA	2,6 aB	3,2 aA	2,2 aB	3,6 aA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si e pertencem a um mesmo grupo pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas distintas dentro de cada variável diferem entre si pelo Teste de F. ** Brotos mortos.

Para ambos os tratamentos, o comprimento das brotações, de um modo geral, foi superior no segundo subcultivo e não diferiu entre as variedades estudadas (Tabela 2). De acordo com Cid e Carvalho (2008) o conhecimento sobre o tamanho das plantas, em termos de cultura de tecidos, é adequado por que denota se as condições *in vitro* foram favoráveis ao crescimento e desenvolvimento dos cultivos.

Para a cana-de-açúcar que apresenta um crescimento rápido e um consumo acelerado dos nutrientes disponíveis no meio de cultura, este trabalho representa um avanço para a manutenção de germoplasma em condições assépticas e controladas. Conforme os resultados apresentados, a recuperação do crescimento é rápida e o potencial de multiplicação é mantido mesmo após o período de armazenamento.

Entretanto, Liu, Wang e Liu (2004) declararam que o objetivo da conservação de recursos genéticos de plantas engloba não só o armazenamento de germoplasma, mas também a manutenção de níveis reduzidos de variações do material durante este período. Para esses autores, qualquer método de conservação pode ser utilizado desde que o material genético permaneça geneticamente estável.

3.1.1 Análise da estabilidade genômica por citometria de fluxo

A quantidade de DNA determinada por citometria de fluxo foi realizada durante o período inicial (controle), intermediário (6 meses) e final (12 meses) da conservação *in vitro* de dez variedades de cana-de-açúcar. De maneira geral, a análise de folhas mais internas e jovens das brotações *in vitro* resultou em um

pico G1 de DNA com boa precisão e coeficientes de variação inferiores à 3% (Figura 2).

Pela análise dos histogramas, verificou-se que apesar das plantas de cana-de-açúcar terem, de modo geral, tolerado as condições impostas de conservação e permanecido morfológicamente normais durante todo o experimento, estas apresentaram instabilidade genômica nos 12 meses de conservação *in vitro*.

Na Tabela 3, pode-se verificar uma redução significativa na quantidade relativa de DNA estimada aos doze meses de conservação *in vitro*, para a maioria das variedades analisadas. Exceto para a variedade VAT 90-212, onde a redução foi observada já a partir dos seis meses de armazenamento.

Inicialmente ao experimento de conservação, o conteúdo estimado de DNA variou em torno de 12,2 a 12,8 picogramas (pg). Após o armazenamento por crescimento mínimo *in vitro*, induzido através de modificações na composição do meio de cultura e no ambiente físico, os valores observados foram inferiores a 12,05 pg, alterando em maior e menor valores entre as variedades.

A variedade SP784764 foi a única que estatisticamente não diferiu quanto à quantidade relativa de DNA dos brotos, nos três tempos analisados (Tabela 3).

Com relação ao meio de origem, observou-se que as reduções na quantidade de DNA ocorreram em plantas armazenadas tanto na presença do ABA (MC1), quanto na sua ausência (MC2).

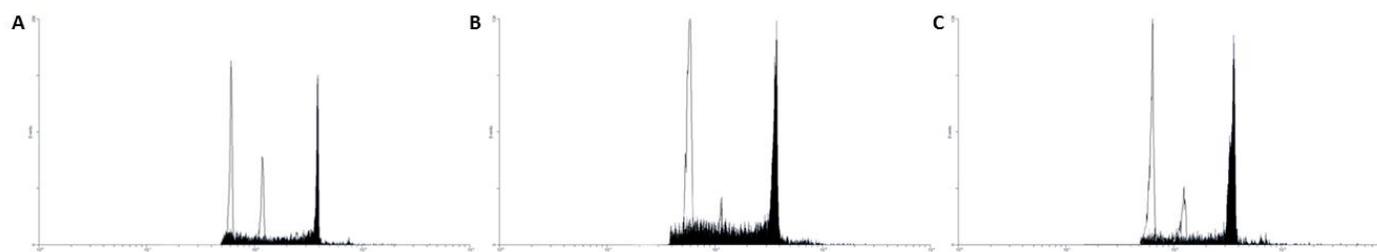


Figura 2 Histogramas relativos à análise por citometria de fluxo da quantidade de DNA em cana-de-açúcar obtidos usando o tampão Marie. O primeiro pico corresponde ao padrão tomateiro e o segundo pico corresponde à variedade SP 854594. A: Tratamento controle; B: 6 meses de conservação; C: 12 meses de conservação.

Tabela 3 Conteúdo médio de DNA relativo (pg) de variedades brasileiras de cana-de-açúcar ao longo do período de conservação *in vitro* em meio de cultura de crescimento mínimo. UFLA, Lavras-MG, 2013.

Período de Conservação	Variedades									
	RB83160	VAT90186	VAT90212	RB99395	SP701143	RB863129	SP854594	SP784764	RB845210	SP716949
Controle	12,67 a	12,45 a	12,4 a	12,30 a	12,53 a	12,26 a	12,37 a	12,18 a	12,87 a	12,81 a
6 meses	12,46 a	12,41 a	11,81 b	12,11 ab	12,47 a	12,21 a	12,34 a	12,39 a	12,86 a	12,82 a
12 meses	11,85 b	12,05 b	11,90 b	11,83 b	11,66 b	11,42 b	11,50 b	12,28 a	11,91 b	12,01 b

* Médias seguidas por mesma letra, pertencem ao mesmo grupo, pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O tamanho relativo do genoma da cana-de-açúcar está relacionado com o número de cromossomos (ZHANG et al., 2012). E como a espécie apresenta um dos genomas mais complexos do reino vegetal, podemos supor a partir destes resultados que a condição de estresse causada pelo ambiente *in vitro* pode ter proporcionado à ocorrência de quebras cromossômicas e/ou cromossomos perdidos, resultado do período prolongado de armazenamento.

Alguns autores acreditam que a replicação tardia da heterocromatina em resposta às condições *in vitro* e/ou às variações nos níveis de metilação do DNA podem conduzir à formação de pontes, quebras cromossômicas ou rearranjos (KAEPLER; KAEPLER; RHEE, 2000). Entretanto, muitas dúvidas ainda precisam ser elucidadas, até porque, variações somaclonais têm sido manifestadas em diversas espécies vegetais.

Jin et al. (2008) verificaram uma redução na quantidade relativa de DNA em plantas de *Gossypium hirsutum* regeneradas *in vitro*. De acordo com estes autores, a contagem cromossômica confirmou os resultados observados pela citometria de fluxo e demonstrou a ocorrência de plantas aneuploides, com perdas de 4 a 5 cromossomos.

Somaclones de banananeira derivados da cultura de meristema *in vitro* obtiveram um conteúdo de DNA das folhas significativamente menor (1,72 pg) quando comparados com plantas normais, com valor estimado de 1,82 picogramas (MSOGOYA; GROUT; ROBERTS, 2011). Além disso, estes autores verificaram que os somaclones apresentaram menor nível global de metilação do DNA.

Prado et al. (2010) detectaram variantes somaclonais em regenerantes provenientes da embriogênese somática durante a caracterização de cultivares de

Vitis vinefera. Já Madon et al. (2012) verificaram diferente conteúdo de DNA, não só nos clones de *Elaeis guineenses*, mas também nos três tipos de calos observados – friáveis, nodulares e nodulares com estruturas radiculares.

Neste trabalho, apesar da redução na quantidade relativa de DNA observada pela análise de citometria de fluxo para a maioria das variedades analisadas, estudos mais aprofundados e análises citogenéticas devem ser realizados neste material para detectar e confirmar qualquer tipo de perda ou anomalia cromossômica. Além disso, como as plantas eram aparentemente normais, recomenda-se a aclimatização em casa de vegetação e o acompanhamento de seu desenvolvimento neste ambiente externo.

Sobhakumari (2012) detectaram por meio de estudos citológicos variações no número de cromossomos, bem como cromossomos fragmentados em plantas de cana-de-açúcar regeneradas via embriogênese somática. Entretanto, neste caso, variações fenotípicas também foram observadas.

Ao contrário destes relatos, inúmeras outras espécies avaliadas não apresentaram variação no conteúdo relativo de DNA em plantas regeneradas e propagadas *in vitro* (BRITO et al., 2010; SILVA et al., 2011; OCHATT; CONREUX; JACAS, 2013), o que garante a eficiência das técnicas de cultura de tecidos na produção de mudas uniformes e geneticamente estáveis. Entretanto, relatos da estabilidade genômica por citometria de fluxo em plantas conservadas *in vitro* ainda são escassos e para a cana-de-açúcar, inexistentes.

Apesar das inúmeras vantagens da técnica de crescimento mínimo *in vitro*, esta apresenta limitações como, por exemplo, a possibilidade de se acumular células que variam geneticamente de acordo com o tempo de armazenamento, em virtude das condições aplicadas (SCHERWINSKI-

PEREIRA; COSTA, 2010). E diante dos resultados encontrados, tanto na sobrevivência dos brotos quanto na sua estabilidade, conclui-se que a cana-de-açúcar pode ser conservada *in vitro* com sucesso e sem variações genômicas por pelo menos seis meses, sem a necessidade de subcultivos. Contudo, após este período, o armazenamento deve ser monitorado periodicamente para garantir a estabilidade genética do material vegetal nestas condições.

3.2 Criopreservação de ápices caulinares de cana-de-açúcar pela técnica de *Droplet vitrification*

O protocolo de *droplet vitrification* (DV) consistiu de várias etapas sucessivas que incluiu pré-cultivo em meio contendo alta concentração de sacarose, osmoproteção com *loading solution* (LS), desidratação com solução de vitrificação (PVS 2), imersão direta no nitrogênio líquido (NL) e descongelamento em *unloading solution* (US). Diante disso, a manipulação dos ápices de maneira cuidadosa e delicada demonstrou ser um passo essencial para a minimização de qualquer tipo de dano aos explantes durante os procedimentos.

Ademais, experimentos anteriores realizados no laboratório demonstraram que o tamanho do ápice inferior a 1 mm prejudicou a recuperação do crescimento dos mesmos. Esses resultados estão de acordo com Ramgareeb et al. (2010) quando declaram que o tamanho do meristema influencia o desenvolvimento de novos brotos. Para eles, o tamanho mais responsivo encontra-se entre 1 a 2 mm, uma vez que estão envoltos em 1 a 3 primórdios foliares.

De acordo com Panis et al. (2011), uma vez que a parte mais meristemática dos ápices caulinares (às vezes, poucas camadas de células) irá sobreviver à criopreservação, as condições de cultivos precisam ser previamente estabelecidas para permitir que este pequeno tecido se regenere em uma planta normal.

Então, a partir dos cuidados adotados, o efeito da extração dos ápices e a tolerância destes a desidratação pelas soluções altamente concentradas de vitrificação podem-se ser verificados na Tabela 4, tomando como base os resultados de regeneração.

Tabela 4 Efeito da desidratação induzida pela solução de vitrificação (PVS 2) na regeneração e no desenvolvimento dos ápices caulinares de cana-de-açúcar. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 2013.

Tempo exposição ao PVS 2 (min.)	Regeneração (%)	Nº de brotos	Altura (cm)
0	90 ^{n.s.**}	2,5 ^{n.s.}	2,5 a
20	90	2,4	1,1 b
30	80	2,4	1,5 b

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. **n.s.: não significativo

A taxa média de aproximadamente 85% de regeneração dos explantes, quando não expostos à temperatura de -196 °C do NL, demonstra que a solução PVS 2 não apresentou efeito tóxico e/ou injúrias osmótica nos ápices de cana-de-açúcar. Estes resultados foram comparados com o tratamento controle, onde os ápices não foram expostos às soluções crioprotetoras e apresentaram 90% de regeneração.

O período de duração na qual os explantes são tratados com as soluções crioprotetoras (PVS 2) é de extrema importância, uma vez que determina a extensão da desidratação celular e a quantidade de componentes que irão permear as células (CHEN et al., 2011). Baseado em Panis et al. (2011) o tempo de tratamento com PVS2 varia consideravelmente entre as espécies, mas normalmente, longos períodos de exposição acabam sendo letais para as células.

Evidências experimentais providas por Volk e Walters (2006) demonstraram dois principais mecanismos de ação da solução crioprotetora sobre os ápices caulinares de *Allium* e *Mentha*: o PVS 2 substituiu a água celular e modificou o comportamento da água remanescente nas células ao congelamento, limitando assim, o risco de formação de cristais de gelo intracelular. De acordo com esses autores, esta solução apresenta mobilidade suficiente, através do DMSO e etileno glicol, para permear a célula à temperatura de 0 °C e permitir que a água seja substituída. Além disso, Volk, Harris e Rotindo (2006) declararam que a baixa temperatura diminui a permeabilidade do glicerol e, assim, ameniza alguns dos seus efeitos negativos causados às células.

Após o tratamento com a solução de vitrificação, constatou-se que o número de brotos secundários formados por explante não diferenciou entre os tratamentos. Contudo, a altura das brotações foi significativamente inferior em ambos os tempos de exposição (média de 1,3 cm), quando comparados com o controle (2,5 cm) (Tabela 4).

De acordo com Guzmán-García, Bradai e Sánchez-Romero (2013) as soluções de crioprotetoras não provocaram um decréscimo significativo na sobrevivência ou recuperação dos explantes de *Persea*, entretanto, causaram

certo atraso no crescimento dos tecidos. Resultados semelhantes também foram verificados na reativação do crescimento de embriões somáticos de *Elaeis guineenses*, contudo, após a exposição ao NL na presença do PVS 2 (SURANTHRAN et al., 2012).

A criopreservação dos ápices caulinares de cana-de-açúcar, variedade SP716949, apresentou redução drástica na sobrevivência quando comparado com os explantes não expostos ao NL. De maneira geral, observou-se que alguns ápices oxidaram ou tornaram-se esbranquiçados, após o congelamento e outros acabaram quebrando os primórdios ao serem manuseados.

Diante dos resultados apresentados na Tabela 5, pode-se constatar uma taxa de 20% de sobrevivência para os explantes tratados por 20 minutos com PVS 2 e 10% para os explantes expostos por período de 30 minutos.

Tabela 5 Regeneração e desenvolvimento dos ápices caulinares de cana-de-açúcar após a imersão em nitrogênio líquido por meio da técnica de *droplet vitrification*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 2013.

Tempo exposição ao PVS 2 (min.)	Regeneração (%)	Nº de brotos	Comprimento (cm)
20	20 ^{n.s.*}	0,2 ^{n.s.}	0,8 ^{n.s.}
30	10	0,1	0,5

* n.s.: não significativo

Resultados similares foram observados por Barraco et al. (2011), onde meristemas apicais de *Limonium serotinum* obtiveram um decréscimo significativo na sobrevivência após a criopreservação. Estes autores verificaram uma alta taxa de viabilidade dos explantes pré-tratados com diferentes formulações de soluções crioprotetoras. Contudo, após exposição ao NL a taxa

de recuperação do crescimento foi de baixa à intermediária (0 a 37%). Para *Prunus cerasifera*, Vujović et al. (2011) relataram que a recuperação do crescimento, após a criopreservação foi de no máximo 20%.

Estes resultados demonstram a sensibilidade dos ápices caulinares de algumas espécies à temperatura de -196 °C fornecidas pelo nitrogênio líquido.

De acordo com Panis et al. (2011), dependendo da espécie alvo, o desenvolvimento de um protocolo adequado envolvendo a técnica pode levar anos de estudo, uma vez que este depende de informações prévias disponíveis na literatura e de características do comportamento da espécie, como por exemplo, se é tropical ou temperada, lenhosa ou herbácea, mono ou dicotiledônea.

Apesar das dificuldades encontradas, várias espécies têm sido criopreservadas com sucesso por meio da técnica de *droplet vitrification* e, algumas vezes, o resultado é significativamente melhor que os outros métodos. Panis, Piette e Swennen (2005) verificaram um aumento de 23–46% na sobrevivência para cultivares de *Musa*, quando comparados com o protocolo normal de vitrificação. Resultado semelhante foi encontrado por Sant et al. (2008) durante a criopreservação de ápice de taro, uma planta tropical.

Halmagyi, Deliu e Isac (2010) analisaram os métodos de *droplet vitrification* (PVS 2) e *droplet* (10% DMSO) para a criopreservação de *Malus* sp. e verificaram a maior taxa de formação de brotos após o congelamento na presença da solução crioprotetora.

A amora preta, uma espécie arbustiva, apresentou resultados distintos durante a conservação de meristemas apicais. O tratamento com PVS 2 modificado resultou em uma taxa máxima de 30% de sobrevivência, enquanto a

exposição à solução de vitrificação PVS3 (50% glicerol e 50% de sacarose) alcançou índices de até 70% (VUJOVIĆ et al., 2011).

Para a cana-de-açúcar, Barraco; Sylvestre; Engelmann (2011) através do primeiro relato de criopreservação utilizando *droplet vitrification*, verificaram que ápices de duas cultivares (H70-144 do Hawaii e CP68-1026 dos EUA) apresentaram tolerância relativamente alta para duas soluções de criopreservação, PVS2 e PVS3. Contudo, a sobrevivência dos explantes após o congelamento foi baixa, atingindo taxas máximas de 20 a 37%, respectivamente. Juntamente com os resultados aqui encontrados, torna-se claro a necessidade de estudos adicionais com a espécie.

Vale ressaltar que as percentagens de sobrevivência e regeneração variam de acordo com as diferentes cultivares, mesmo quando se utiliza o mesmo método de criopreservação (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; CHEN et al., 2011).

Além da viabilidade após os tratamentos, na criopreservação de germoplasma também é importante que os meristemas ou ápices sejam capazes de produzir plantas idênticas à planta doadora (CHEN et al., 2011). Neste trabalho, a regeneração ocorreu de forma direta, ou seja, sem a fase intermediária de calos, que muitas vezes é indesejável por causar instabilidade genética dos regenerantes. Além disso, as plantas desenvolvidas eram fenotipicamente normais e idênticas às doadoras (Figura 3).

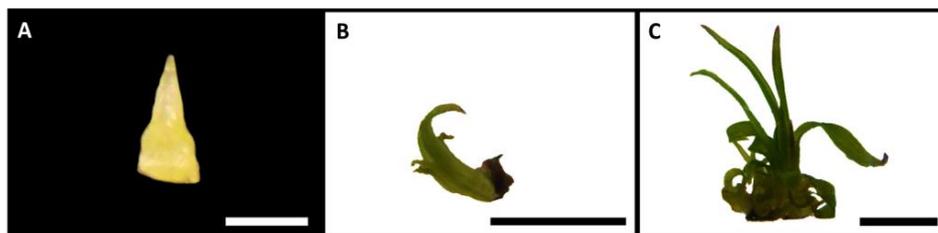


Figura 3 Resposta dos ápices caulinares de cana-de-açúcar após a criopreservação por meio da técnica de *droplet vitrification*. A: ápice caulinar após a extração de plantas *in vitro*; B: Regeneração dos ápices em meio de MS suplementado com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ cinetina à aproximadamente 25 dias após a imersão no nitrogênio líquido; C: Desenvolvimento dos brotos *in vitro*, 40 dias após a criopreservação. (Barras A = 1 mm; B e C = 0,5 cm)

Com relação aos parâmetros de crescimento das plantas criopreservadas, notou-se aos quarenta dias de cultivo uma menor taxa de formação de brotos secundários e menor comprimento dos brotos, média de 0,7 cm (Tabela 5). Provavelmente, esse menor crescimento deve-se ao fato de que a regeneração dos ápices após a imersão em NL foi tardia, aproximadamente sete dias depois que os explantes dos tratamentos controle (-NL). Os resultados encontrados não diferenciaram entre os dois tempos de exposição.

Apesar da taxa de sobrevivência de 20% dos ápices caulinares de cana-de-açúcar criopreservados por *droplet vitrification* não ter sido totalmente satisfatória, este trabalho representa um passo inicial e potencial para a conservação em longo prazo do germoplasma da espécie no Brasil, principalmente pelo fato de não existirem, até no momento, trabalhos de criopreservação envolvendo variedades brasileiras de cana-de-açúcar.

4 CONCLUSÕES

- A combinação do sorbitol com o ácido abscísico e a temperatura reduzida prejudica a sobrevivência dos brotos durante a conservação *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar.
- Variedades de cana-de-açúcar podem ser armazenadas à 18 °C, em meio contendo metade das concentrações salinas de MS e 30 g L⁻¹ de sorbitol, desde que a estabilidade genômica das plantas seja monitorada periodicamente a partir do sexto mês de conservação.
- A recuperação do crescimento dos brotos de cana-de-açúcar, após o período de conservação, é rápida e a capacidade de multiplicação recuperada a partir do segundo subcultivo.
- A regeneração de 20% dos ápices após o congelamento em nitrogênio líquido (-196 °C) representa o primeiro protocolo de criopreservação com sobrevivência dos explantes para uma variedade brasileira de cana-de-açúcar.
- A criopreservação de ápices caulinares de cana-de-açúcar, variedade SP 716949, por meio da técnica de *droplet vitrification* é promissora e demonstra a capacidade de conservação de germoplasma da espécie a partir de estudos adicionais e otimização de etapas.

REFERÊNCIAS

AHMED, M.; ANJUM, M. A. *In vitro* storage of some pear genotypes with the minimal growth technique. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 34, n. 1, p. 25-32, 2010.

BARRACO, G. et al. Cryopreservation of *Limonium serotinum* apical meristems from *in vitro* plantlets using droplet-vitrification. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 309-313, Aug. 2011.

BARRACO, G.; SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 320-324, Aug. 2011.

BRITO, G. et al. Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. **Trees**, v. 24, n. 4, p. 723-732, Aug. 2010.

CARVALHO, F. de. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 814-820, maio/jun. 2007.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n.1, p. 62-89, Mar. 2011.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 2, p. 397-403, Apr 2011.

CID, L. P. B.; CARVALHO, L. Importance of abscisic acid (ABA) in the *in vitro* conservation of cassava (*Manihot esculenta* CRANTZ). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 68, n. 3, p. 304-308, July/Sept. 2008.

DANSO, K. E.; FORD-LLYOD, B. V. The effect of abscisic acid and sucrose on post-thaw embryogenic competence and subsequent plant recovery from

embryogenic calli of cassava **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 3, n. 4, p. 663-671, 2008.

LEMOS, E. E. P. et al. *In vitro* conservation of sugarcane germplasm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, Oct. 2002.

DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVAK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear-DNA amount in diploid banana (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Compenhagen, v. 36, n. 3, p. 351-357, 1994.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plantbiodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n.1 p. 5–16, 2011.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GILL, R.; MALHOTRA, P. K.; GOSAL, S. S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 84, n. 2, p. 227-231, Feb 2006.

GNANAPRAGASAM, S.; VASIL, I. K. Plant regeneration from a cryopreserved embryogenic cell suspension of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, n. 8, p. 419-423, 1990.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 303-308, 1993.

GOPAL, J.; CHAMAIL, A.; SARKAR, D. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 485-490, Sept./Oct. 2004.

- GUZMAN-GARCIA, E.; BRADAI, F.; SANCHEZ-ROMERO, C.
Cryopreservation of avocado embryogenic cultures using the droplet-vitrification method. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 1, p. 183-193, Jan. 2013.
- HALMAGYI, A.; DELIE, C.; ISAC, V. Cryopreservation of *Malus* cultivars: Comparison of two droplet protocols. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, n. 3, p. 387-392, Apr. 2010.
- JIN, S. et al. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 8, p. 1303-1316, Aug. 2008.
- KAEPPLER, S. M.; KAEPPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 43, n. 2-3, p. 179-188, June 2000.
- LATA, H. et al. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 46, n. 1, p. 22-27, Feb. 2010.
- LIU, Y. G.; WANG, X. Y.; LIU, L. X. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification. **Plant Science**, Limerick, v. 166, n. 3, p. 677-685, Mar. 2004.
- MADON, M. et al. Analysis of oil palm calli and regenerants using flow and image cyotmetry and 18S-25S ribossomal DNA fluorescence *in situ* hybridisation (FISH). **Journal of Oil Palm Research**, v. 24, p. 1318-1329, Apr. 2012.
- MARIE, D.; BROWN, S. C. A. Cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C-values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993.
- MARINO, G. et al. Effect of carbohydrates on *in vitro* low-temperature storage of shoot cultures of apricot. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 126, n. 4, p. 434-440, Oct. 2010.

- MARTINEZ-MONTERO, M. E. et al. Cryopreservation of sugarcane embryogenic callus using a simplified freezing process. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 171-176, 1998.
- MARTINEZ-MONTERO, M. E.; MARTINEZ, J.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of sugarcane somatic embryos. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 29, n. 3, p. 229-242, 2008.
- MSOGOYA, T. J.; GROUT, B. W.; ROBERTS, A. Reduction in genome size and DNA methylation alters plant and fruit development in tissue culture induced off-type banana (*Musa* spp.). **Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 11, n. 3, p. 1450-1456, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAIDU, M. M.; SREENATH, H. L. *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm preservation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 55, n. 3, p. 227-230, 1999.
- OCHATT, S. J.; CONREUX, C.; JACAS, L. Flow cytometry distinction between species and between landraces within *Lathyrus* species and assessment of true-to-type-ness of *in vitro* regenerants. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 299, n. 1, p. 75-85, Jan. 2013.
- PANIS, B. et al. Droplet vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 908, n. 1, p. 157-164, 2011.
- PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.
- POPOVA, E. V. et al. A simple method for cryopreservation of *Ginkgo biloba* callus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 97, n. 3, p. 337-343, June 2009.

PRADO, M. J. et al. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 103, n. 1, p. 49-59, Oct. 2010.

RAI, M. K. et al. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 106, n. 2, p. 179-190, Aug. 2011.

RAMGAREEB, S. et al. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 100, n. 2, p. 175-181, Feb. 2010.

ROACH, B.T. Case for a core collection of sugarcane germplasm. **Proceedings of International Society of Sugarcane Technology**, v. 21, p. 339-350, 1995.

SÁ, A. D. J.; LÉDO, A. D. S.; SILVA LÉDO, C. A. D. S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryoletters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, May/June 2007.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* osb var *brasiliensis* tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 30-33, June 1990.

SANT, R. et al. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 107-111, Jan. 2008.

SANTOS, M. D. C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

SARWAR, M.; SIDDIQUI, S. U. *In vitro* conservation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) germplasm. **Pakistan Journal of Botany**, v. 36, n. 3, p. 549-556, Sept. 2004.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p.177-234.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 263-269, May 2012.

SILVA, C. V. et al. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passion fruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 407-416, Dec. 2011.

SILVA, R. de C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 111, n. 1, p. 59-67, Oct. 2012.

SILVA, T. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 4, p. 384-389, Apr. 2011.

SOBHAKUMARI, V. P. Assessment of somaclonal variation in sugarcane. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 87, p. 15303-15309, Oct. 2012.

- SURANTHRAN, P. et al. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. **Plant Growth Regulation: an international journal on plant growth and development**, Dordrecht, v. 66, n. 2, p. 101-109, Mar. 2012.
- VOLK, G. M.; HARRIS, J. L.; ROTINDO, K. E. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. **Cryobiology**, San Diego, v. 52, n. 2, p. 305-308, Apr. 2006.
- VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, San Diego, v. 52, n. 1, p. 48-61, Feb. 2006.
- VUJOVIC, T. et al. Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 222-228, Aug. 2011.
- WATT, M. P. et al. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 61, n. 2, p. 161-164, 2000.
- ZHANG, J. et al. Genome size variation in three *Saccharum species*. **Euphytica**, Wageningen, v. 185, n. 3, p. 511-519, June 2012.