

Comparação de meios de cultura para organogênese direta de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)

RAPOSO, Mariane Soares
GOIA, Talita Gabriela
NASCIMENTO, Daniela Defavari do
OLIVEIRA, Enio Tiago de

Resumo

Foram analisadas duas formulações de meios de cultura para organogênese direta de explantes de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), os meios de cultura MS3c e MS3k, ambos baseados na formulação basal de M&S (MURASHIGE & SKOOG, 1962). O MS3c foi acrescido de 50 mL de água de coco e 3 mg.L⁻¹ de ácido 2,4 diclorofenoxi acético (2,4D) e no MS3k, a água de coco foi substituída por 0,1 mg.L⁻¹ de 6-furfurilaminopurina (cinetina). Foram feitas observações com relação ao comportamento da cultura submetida a tais cultivos. Observaram-se melhores resultados de organogênese direta no meio MS3c, pois apresentou alto rendimento na regeneração de plantas.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, organogênese direta, meio de cultura.

Abstract

Two formulations of culture media for direct organogenesis of sugar cane explants (*Saccharum spp.*) were analyzed: MS3c and MS3k. Both formulations are based on the M&S formulation (MURASHIGE & SKOOG, 1962). MS3c was supplemented by 50 mL of coconut water and 3 mg.L⁻¹ 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D); in the MS3k formulation, coconut water was replaced by 0.1 mg.L⁻¹ 6-furfurylaminopurine (kinetin). Observations were made regarding the behavior of culture subjected to such media formulations. We observed better results for direct organogenesis in the MS3c media, where higher regeneration of plants was obtained.

Keywords: sugar cane, direct organogenesis, culture media.

Resumen

Se analizaron dos formulaciones de medios de cultivo para organogénesis directa de los explantes de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*). Los medios de cultivo MS3c y MS3k, ambos basados en la formulación M & S (MURASHIGE & SKOOG, 1962). El MS3c se añadió 50 mL de agua de coco y 3 mg.L⁻¹ ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) y MS3k, agua de coco fue sustituido por 0,1 mg.L⁻¹ 6-furfurilaminopurina (cinetina). Se hicieron observaciones sobre el comportamiento de la cultura sometida a tales cultivos.

Fueron observados mejores resultados de organogénesis directa en el medio MS3c, que presento mejor regeneración de plantas.

Palabras clave: caña de azúcar, organogénesis directa, medio de cultura.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no século XVI pelos portugueses inicialmente em Pernambuco e São Paulo (BRAUNBECK & CORTEZ, 2008). Ela pertence à família *Poaceae* e ao gênero *Saccharum*, e atualmente sua produção comercial, normalmente, se dá pelo uso de híbridos (FIGUEIREDO, 2010).

A cultura é de suma importância para o mundo, pois é através de sua produção que se obtém grande número de produtos, sejam para ração animal, combustível, energia elétrica ou alimentos. A modernização do setor sucroalcooleiro se deu pela alta dos preços do açúcar no mercado internacional em 1960 e pelo programa brasileiro Proálcool na década de 1970, que teve o intuito de incentivar a produção de álcool utilizando biomassa (FIGUEIREDO, 2010). Atualmente, para atender o aumento da demanda de cana-de-açúcar, se faz necessário o melhoramento da cultura, para que haja aumento de produtividade sem aumentar a área de plantio.

O objetivo principal do melhoramento é a obtenção de novos cultivares capazes de promover o aumento da produção de açúcar e álcool (LANDELL & BRESSIANI, 2010). Os programas de melhoramento genético fazem uso da micropropagação vegetativa, utilizando técnicas da cultura de tecidos para que consiga de forma controlada, a clonagem de indivíduos geneticamente melhorados em pequeno espaço físico e cronológico.

A micropropagação vegetativa também é utilizada comercialmente, revelando, uma oportunidade de investimento cada vez mais atraente: a criação de biofábricas, objetivando a produção de mudas sadias em larga escala (Brazilio *et al.*, 2012), como ocorre em algumas empresas fornecedoras de mudas e em usinas.

CULTURA DE TECIDOS E MICROPROPAGAÇÃO

O processo de cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado sob condições assépticas, em meio nutritivo artificial. Este processo baseia-se no princípio da totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula de organismo vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (PASQUAL *et al.*, 2001; GALLO & CROCOMO, 1995 apud PASQUAL *et al.*, 2008).

Em área comercial, como no setor sucroalcooleiro, há necessidade de mudas sadias de cana-de-açúcar para o plantio, com isso muitas usinas possuem biofábricas, onde é realizada a micropropagação vegetativa em larga escala utilizando técnicas de cultura de tecidos. Debergh e Read (1991) relatam que na micropropagação é utilizada a propagação vegetativa em massa de culturas que possuem valor econômico de interesse.

A micropropagação pode ser dividida em estágios que devem ser seguidos para proporcionar sucesso na clonagem de plantas. Esses estágios são: limpeza do explante, inoculação em meio de cultura, desenvolvimento e crescimento, multiplicação do indivíduo e a aclimação (DEBERGH & READ, 1991).

MEIO DE CULTURA

Segundo Zhang e colaboradores (2003 apud Cid & Teixeira 2010), os meios nutritivos e a sua composição operam o “milagre” da vida, ou seja, a conversão dos explantes em plântulas e das plântulas em mudas, as quais tem o caráter clonal embutido em sua natureza e, por isso, possuem caráter de genótipo superior.

Os meios de cultura são compostos de sais inorgânicos (macro e micronutrientes), açúcares e outras misturas orgânicas e complexas como água de coco (CID & TEIXEIRA, 2010).

Além dos macro e micronutrientes há necessidade da adição de açúcares como fonte de carbono, pelo fato de que a fotossíntese de plantas *in vitro* é limitada. A sacarose é o açúcar que apresenta melhor resultado em meios de cultura. Segundo Tambarussi (2009), a sacarose apresenta maior eficiência em meios de cultura para organogênese *in vitro*.

Para que as plantas *in vitro* possam suporte quando postas em meio de cultura, se faz necessário o uso de agentes solidificantes como agar ou phytagel. O pH dos meios de cultura deve ser estabilizado para 5,8, propício para melhor aproveitamento dos nutrientes pelas plantas.

HORMÔNIOS

Os hormônios são biomoléculas produzidas pelas plantas, cuja função, é proporcionar crescimento das estruturas do vegetal. Entre essas biomoléculas estão as auxinas, citocininas, giberelina, entre outras. Porém, é possível a produção dessas biomoléculas sinteticamente, são os chamados reguladores de crescimento, cuja função é semelhante a dos hormônios (CID & TEIXEIRA, 2010).

Na cultura de tecidos, as auxinas e as citocininas, sejam naturais ou sintéticas, são os fitorreguladores mais utilizados (CID & TEIXEIRA, 2010). Para preparo dos meios de cultura são adicionadas doses do hormônio ou regulador de crescimento em proporções adequadas para não causar inibição e nem estimulação exagerada de crescimento (COUTINHO, 1973).

As auxinas, segundo Coutinho (1973), constituíram o primeiro grupo de fitormônios a ser identificado como tal. As observações mais significativas a respeito destas substâncias datam de 1880, quando Charles Darwin demonstrou, de maneira simples, a fotossensibilidade do ápice de coleóptiles de sementes recém germinadas de alpiste (*Phalaris canariensis*).

As auxinas são produzidas pelo ápice dos caules, folhas, raízes e embriões de sementes. As funções que elas apresentam nos vegetais não necessariamente ficam limitadas ao crescimento, mas funcionam, também, como inibidor de crescimento e como estimulador de

divisão celular. Todavia, elas influenciam no crescimento do vegetal não pelo aumento de número de células e sim pelo alongamento das mesmas. Sem a presença das auxinas ocorreria a lise da parede celular pelo fato de a mesma não suportar a distensão das células (COUTINHO, 1973).

O ácido β -in-dolil-acético (AIA) é a auxina que apresenta maior abundância no vegetal. Já o ácido inoil-acético (NOA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) e ácido α -naftaleno-acético (ANA), são produzidos sinteticamente (COUTINHO, 1973)

As citocininas são hormônios que atuam na citocinese celular, ou seja, na divisão citoplasmática. Segundo Coutinho (1973), este grupo de substâncias reguladoras do crescimento e do desenvolvimento das plantas foram descobertas em 1955 por Miller e colaboradores nos E.U.A. Assim o hormônio recebeu o nome de citocinina, devido à sua ação sobre a citocinese.

As citocininas podem ser encontradas nas raízes e posteriormente são distribuídas para os novos brotos ocorrendo assim a divisão das células. Coutinho (1973) relata que para a citocinina cumprir seu papel, é necessário que esteja em conjunto com doses de auxinas. Se a proporção de citocinina for baixa, há intensa produção de raízes e pouco desenvolvimento de calos. Em uma proporção intermediária há proliferação somente de calos sem qualquer diferenciação dos mesmos. Quando a proporção de citocinina é mais elevada, o calo desenvolvido inicialmente origina um grande número de brotos caulinares. Como exemplo de citocinina encontrada nos vegetais pode-se citar a zeatina e como citocinina sintética, a cinetina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados palmitos (folhas imaturas) de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) variedade SP803280 cultivadas em uma área de modo convencional no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) situado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo em Piracicaba-SP. Coletadas, as canas foram desbastadas e após sobrar somente o ponteiro denominado “palmito”, foram lavados em álcool 70% por três vezes sem reutilização das soluções.

Após isso, os palmitos foram levados para a câmara de fluxo laminar, onde se realizaram cortes longitudinais com bisturi esterilizado, obtendo explantes em formato de disco, que imediatamente após cortados, foram mergulhados em placas com ácido cítrico 150 mg.L^{-1} para evitar oxidação. Foi necessário manuseá-los adequadamente para não ocorrer contato dos discos com as pontas do palmito, que sem o devido cuidado pode acarretar em contaminações.

Feito isso, os discos foram retirados do ácido cítrico e colocados em papel de filtro para retirada do excesso de solução. Assim, os discos foram inoculados em placas de Petri autoclavadas contendo 30 mL de meio de cultura. Em média, para cada palmito, o rendimento foi de 15 discos onde os mesmos foram inoculados em uma única placa para controle de possíveis contaminações.

Foram utilizados os meios de cultura, MS3c e MS3k (Tabela 1), baseados na formulação basal de M&S (Murashige and Skoog, 1962), O MS3c foi acrescido de 50 mL de água de coco e 3

mg.L⁻¹ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) e no MS3k a água de coco foi substituída por 0,1 mg.L⁻¹ de 6-furfuril aminopurina (cinetina). Os discos foram mantidos nessas formulações por 15 dias sem a presença de luz. Posteriormente a esse período os discos foram passados para vidros com meio MRP (Tabela 1) na presença de luz por 16 horas/dia e temperatura de 27°C ± 1°C, sendo 10 vidros contendo 5 discos cada que anteriormente estavam em MS3c e 10 vidros contendo 5 discos cada para os que estavam em MS3k.

Após 30 dias, os discos foram passados para meio MS (Tabela 1) e continuaram na presença de luz. Passado igual período, haviam plantas regeneradas e por isso os discos foram repicados separando tecidos mortos e plantas regeneradas. As plantas já formadas e os tecidos ainda em início de regeneração foram transferidos para MS fresco por mais 30 dias, totalizando, portanto, 60 dias em meio MS.

Todo o cronograma de troca de formulação, de meios e tempos de permanência em cada um deles está representado também de forma esquemática na figura 1.

Tabela 1: Composição dos meios de cultura e os hormônios adicionados, usando como base a formulação de M&S (Murashige and Skoog 1962). O pH dos meios foi aferido para 5,8.

Ingredientes	MS	MS3c	MS3k	MRP
Sais minerais	M&S	M&S	M&S	M&S
Sacarose	50g.L ⁻¹	30g.L ⁻¹	30g.L ⁻¹	30g.L ⁻¹
Água de coco	-	50mL.L ⁻¹	-	-
2,4D	-	3mg.L ⁻¹	3mg.L ⁻¹	-
Ácido cítrico	-	0,5mg.L ⁻¹	0,5mg.L ⁻¹	-
Cinetina	-	-	0,1mg.L ⁻¹	-
NAA	-	-	-	3,72mg.L ⁻¹
BAP	-	-	-	0,45mg.L ⁻¹

O acompanhamento foi feito diariamente, observando as regenerações, desenvolvimento e contaminação das plantas. Quando ocorria contaminação, seja por bactéria ou fungo, eram salvos os discos ou plantas que não estavam em contato com o microrganismo, passando os discos ou plantas livres de contaminação para outro vidro e os que estavam em contato com a contaminação foram descartados.

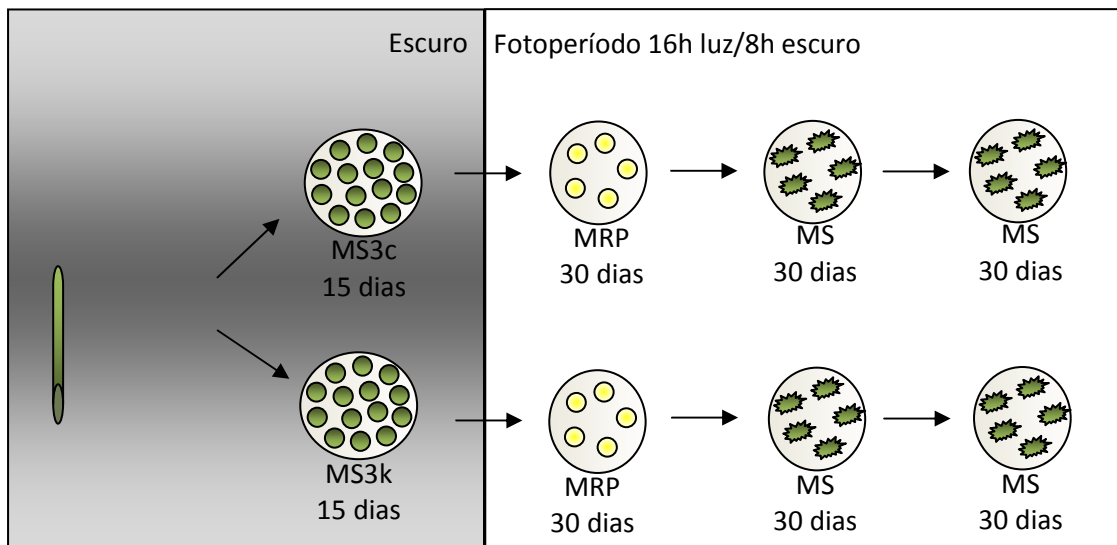


Figura 1: Cronograma de transferência de meios de cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os meios de cultura apresentaram diferenças no comportamento regenerativo somente quando os discos já haviam sido transferidos dos meios MS3c ou MS3k e já estavam na presença de luz e em meios de regeneração (MRP). Com as observações realizadas foi possível notar diferenças em relação ao processo regenerativo e ao rendimento de plantas.

A primeira mudança ocorrida, na presença de luz e em meio MRP, foi a alteração na coloração dos discos, passando de creme para esverdeado, onde os discos que inicialmente estavam em MS3c apresentaram essas mudanças antes dos que estavam em MS3k.

Após transferência dos discos para MS, estes iniciaram o processo de diferenciação, onde algumas estruturas do vegetal são formadas, como folhas, por exemplo. Ocorreu a formação de estruturas de coloração roxa que posteriormente deram origem às raízes. Após 30 dias em MS, os discos que anteriormente estavam em MS3c apresentaram melhor diferenciação, e melhor rendimento no número de plantas, como demonstrado na figura 2.

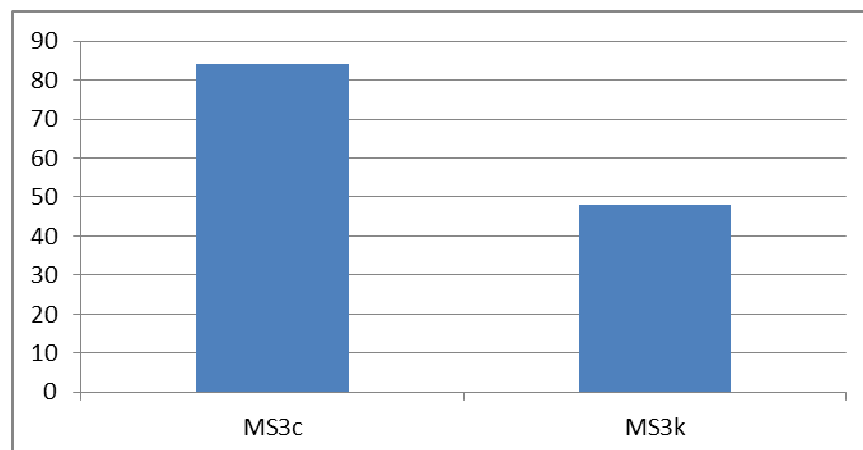


Figura 2: Rendimento de plantas regeneradas. Em MS3c, o rendimento foi de 84 plantas obtidas, já em MS3k, o número foi de 48.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, a seguir, após 60 dias em MS, foi possível notar que o rendimento das plantas provenientes do tratamento com o meio MS3c foi extremamente superior ao rendimento dos discos inoculados em MS3k, que utilizou citocinina sintética (cinetina), diferentemente do MS3c com hormônio natural propiciado pela água de coco. Piceli (2010) relata que apesar da água de coco não ter sua composição conhecida, ela é utilizada em meios de cultura por ser um endosperma do fruto e com isso possui biorreguladores de crescimento, além de açúcares e aminoácidos, promovendo assim a divisão celular. Na figura 3, pode-se observar graficamente o potencial regenerativo final mostrando que a produtividade final de plantas quando se utiliza o meio MS3c é muito superior ao uso de MS3k.

O estado regenerativo das plantas obtidas foi avaliado como bom já que as plantas apresentaram folhas, caules e raízes formados. Seria regular, se apresentassem apenas folhas e caules; e ruim, se estivessem em início de regeneração e sem presença de estruturas bem definidas.

Tabela 2: Comparação dos meios de cultura.

Meio de Cultura	Rendimento	Estado Regenerativo	Oxidação
MS3c	554	Bom	Moderado
MS3k	128	Bom	Moderado

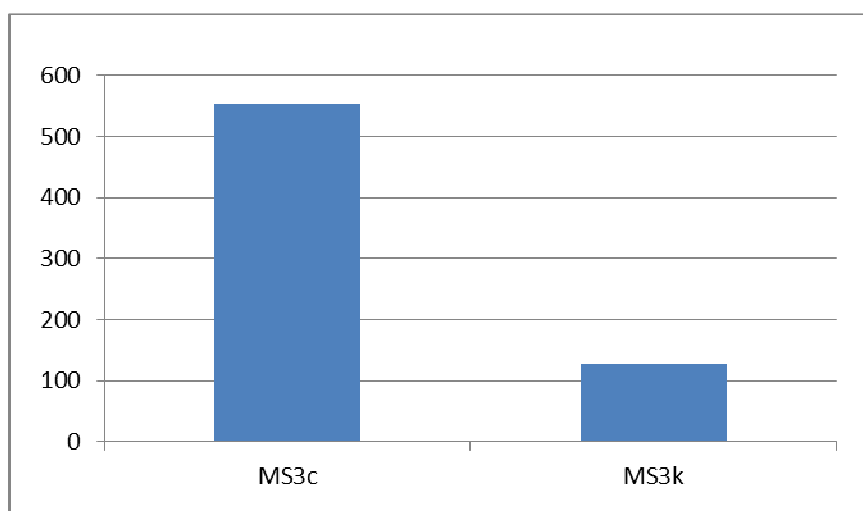


Figura 3: Potencial regenerativo de plantas em cada meio de cultura avaliado.

CONCLUSÃO

Para melhores resultados na obtenção de clones de cana via organogênese direta de discos, é conveniente a utilização inicial do meio MS3c contendo 50 mL^{-1} de água de coco por 15 dias no escuro.

A água de coco é um suplemento capaz de oferecer hormônios naturais para o crescimento celular, promovendo regeneração de células de cana.

REFERÊNCIAS

BRAUNBECK, O.A. e CORTEZ, L.A.B. O cultivo de cana-de-açúcar e o uso dos resíduos. In: FRANCK ROSILLO-CALLE; BAJAY. S.V.; ROTHMAN, H. **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas, SP. UNICAMP. 2008. cap. 5. 215.

BRAZILIO, M.; BISTACHIO, N.J.; SILVA, V.C.; NASCIMENTO, D.D. O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Bioenergia em Revista: diálogos**, v.2, n.1, p.27-45, jan./jun. 2012.

CID, L, P, B; TEIXEIRA, J.B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L.P. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF. EMBRAPA. 2010. cap. 1. 25-30. 1ed.

COUTINHO, L. M. Forma e função. Controle de Crescimento e Desenvolvimento. In: **Curso de ciências biológicas: Botânica**. São Paulo, SP: Cultrix, 1973. cap. 3, 208- 226. 4 v.

DEBERGH, P.C. & READ, P.E. Micropropagation. In: Debergh, P.C. & Zimmerman, R.H. **Micropropagation: Technology and Application**. London, Kluwer Acad. Publishers, 1991. p 1-2.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do instituto agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: LEILA LUCI DINARDO-MIRANDA; VAZCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M.G.A. de. **Cana-de-açúcar**. Campinas, SP: IAC, 2010. cap. 1, 31-40. 1v.

LANDELL M.G.A. de; BRESSIANI, J.A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: LEILA LUCI DINARDO-MIRANDA; VAZCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M.G.A. de. **Cana-de-açúcar**. Campinas, SP: IAC, 2010. Cap. 5, 101. 1v.

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

PASQUAL, M. et al. **Micropropagação do abacaxizeiro ornamental**. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v26n1/a09v26n1.pdf>>. Acesso em: 22 de agosto 2012.

PICELI, E. C. M. da. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene Ddm1 no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar**. 2010. 141p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímicas de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TAMBARUSSI, E. V. **Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para a micropropagação, regeneração e transformação genética de tec (Tectona grandis L.f) visando resistência a Hyblaea pueru**. 2009. 122p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de

Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

- 1 Mariane Soares RAPOSO é Tecnóloga em Biocombustíveis pela FATEC Piracicaba.
- 2 Talita Gabriela GOIA é Tecnóloga em Biocombustíveis pela FATEC Piracicaba.
- 3 Daniela Defavari do NASCIMENTO NASCIMENTO possui graduação em Engenharia Agrônoma pela Universidade de São Paulo (1997), graduação em Licenciatura Em Ciências Agrárias pela ESALQ/USP (1998), mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela ESALQ/USP (2000) e doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela ESALQ/USP (2005). Especialista (MBA) em Agronegócios pelo PECEGE/ESALQ/USP (2012). Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: cultura de tecidos, micropropagação de plantas, clonagem gênica, transformação genética de plantas (Tabaco, Arabidopsis, Eucalipto e cana-de-açúcar), análises moleculares, DNA e RNA. Desde 2010 é professora nas disciplinas: Biotecnologia do curso de Graduação em Biocombustíveis, Biologia Celular e Bioquímica Aplicada à Agroindústria do curso de Graduação em Agroindústrias todos da FATEC Piracicaba.
- 4 Enio Tiago de OLIVEIRA é doutor em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/ USP (2007). Mestre em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/ USP (1995). Biólogo pela Universidade Metodista de Piracicaba (1987) e Habilitação plena em química pelo Colégio Industrial Dom Bosco (1982). Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Bioquímica, Fisiologia e Biotecnologia de Plantas. E-mail: etolivei@usp.