CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO E PROTOPLASTOS EM CANA-DE-AÇÚCAR

MARIA CRISTINA FALCO
Engenheira Agrônoma

Orientador : Prof. Dr. AUGUSTO TULMANN NETO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Falco, Maria Cristina
F181c   Cultura de células em suspensão e protoplastos em
cana-de-açúcar. Piracicaba, 1994.
131p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar - Cultura de célula 2. Cana-de-
açúcar - Melhoramento 3. Protoplasto de cana-de-açúcar
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Piracicaba

CDD 633.61

CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO E PROTOPLASTOS EM CANA-DE-AÇÚCAR

MARIA CRISTINA FALCO

Aprovada em: 24/02/1994

Comissão julgadora:

Dr. Augusto Tulmann Neto

CENA/USP

Dra. Beatriz M. Januzzi Mendes

CENA/USP

Dr. Francisco Javier Zapatta Arias

ESALQ/USP

Dr. Augusto Tulmann Neto
orientador

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, e em especial a:

- Dr. Augusto Tulmann Neto
- Dra. Beatriz M. Januzzi Mendes
- Dr. Francisco Javier Zapatta Arias
- Dr. Akihiko Ando
- Dr. Fernando d'Utra Vaz
- Dra. Beatriz Appezato da Glória
- Wanderlei Ap. Pontes
- Benedita Inês Rodrigues
- Wlamir de Aguiar Godoy
- Antônio Augusto Franco Garcia
- Marta Heloísa Pavan Mônaco
- José Baldin Pinheiro
- Alcides Moino Júnior
- Departamento de Genética da ESALQ/USP
- Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA/USP
- COPERSUCAR
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

A Dorival e D'Janira
pelo incentivo.

A Wanderlei,
Ida Maria e Denise.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
SUMMARY	xviii
 1. INTRODUÇÃO	 1
 2. REVISÃO DE LITERATURA	 3
2.1. A Cultura da Cana-de-açúcar	3
2.2. Cultura de Tecidos em Cana-de-açúcar	6
2.2.1. Importância do Melhoramento Genético	6
2.2.2. Indução de Calos	9
2.2.3. Cultura de Células em Suspensão	16
2.2.3.1. Obtenção e Manutenção	16
2.2.3.2. Quantificação do Crescimento	20
2.2.3.3. Diferenciação	22
2.2.4. Cultura de Protoplastos	27
2.2.4.1. Hibridação e Manipulação Genética	27
2.2.4.2. Isolamento de Protoplastos	30
2.2.4.3. Cultivo de Protoplastos	35
2.2.4.4. Regeneração de Plantas	38

3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Cultura de Calos	41
3.1.1. Obtenção e Cultivo dos Calos	41
3.1.1.1. Variedades Utilizadas	41
3.1.1.2. Manutenção das Culturas	43
3.1.2. Regeneração de Plantas a partir de Calos . .	43
3.2. Cultura de Células em Suspensão	45
3.2.1. Obtenção e Manutenção da Suspensão Celular .	45
3.2.2. Quantificação do Crescimento	46
3.2.3. Regeneração de Plantas	49
3.3. Isolamento e Cultivo de Protoplastos	55
3.3.1. Utilizando Calos Embriogênicos	55
3.3.2. Utilizando Células em Suspensão	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1. Cultura de Calos	65
4.1.1. Escolha de meio de cultura	65
4.1.2. Regeneração de Plantas	67
4.2. Cultura de Células em Suspensão	70
4.2.1. Obtenção e Manutenção	70
4.2.2. Quantificação do Crescimento	72
4.2.3. Regeneração de Plantas	88
4.2.4. Discussão	97

	vii
4.3. Isolamento e Cultivo de Protoplastos	101
4.3.1. A partir de Calos Embriogênicos	101
4.3.2. A partir de Células em Suspensão	101
4.3.3. Discussão	108
5. CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE TABELAS

Página

TABELAS

1.	Suplementos adicionados ao meio basal de MS para obtenção de calos e suspensões celulares de cana-de-açúcar	42
2.	Suplementos adicionados ao meio MS para regeneração de plantas em cana-de-açúcar . . .	44
3.	Soluções enzimáticas testadas para isolamento de protoplastos de cana-de-açúcar	57
4.	Meios de cultura testados no cultivo de protoplastos de células em suspensão	58
5.	Formação de calos nos explantes foliares de cana-de-açúcar, em % de explantes que formaram calos após 30 dias	66
6.	Regeneração de plantas a partir de calos da cana-de-açúcar, em % de calos que regeneraram plantas	67

7.	Qualidade das suspensões celulares de cana-de-açúcar, var. SP 79-1011, em diferentes meios de cultura	70
8.	Qualidade das suspensões celulares de cana-de-açúcar, var. SP 70-1143, em diferentes meios de cultura	71
9.	Crescimento da cultura de células em suspensão de cana-de-açúcar, var. SP 70-1143, em nº de células ($\times 10^5$ /ml)	73
10.	Proporção entre células embriogênicas e indesejáveis em cultura de células em suspensão de var. SP 70-1143, no 1º e 9º dias de subcultivo	75
11.	Crescimento da cultura de células em suspensão de var. SP 79-1011, em nº de células ($\times 10^5$ /ml), peso fresco e peso seco (mg/ml)	77
12.	Resultados das análises de variâncias para peso fresco, peso seco e nº de células da var. SP 79-1011, em 10 dias de cultivo	78

x

13. Crescimento da cultura de células em suspensão da var. SP 79-1011, em nº de células ($\times 10^5$ /ml), peso fresco e peso seco(mg/ml) e volume da massa de células (% v/v) 82
14. Resultados das análises de variâncias para peso fresco, peso seco, volume e nº de células em suspensão, var SP 79-1011, em 46 dias de cultivo 83
15. Equações das curvas de crescimento de células em suspensão da var. SP 70-1143, avaliadas por diferentes variáveis 83
16. Efeito de diferentes meios de cultura na regeneração de plantas a partir de células em suspensão das variedades SP 70-1143 e SP 79-1011 96
17. Isolamento de protoplastos de células em suspensão da var. SP 79-1011, com 19 meses de subcultivos 105
18. Aumento de volume observado em protoplastos isolados de células em suspensão, após 4 dias de cultivo, em porcentagem do total de protoplastos contados em determinado campo 106

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURAS

1a.	Formação de calos nodulares (Tipo I) e friáveis (Tipo II) a partir de explantes foliares de cana-de-açúcar, var. SP 70-1143	69
1b.	Regeneração de gemas a partir de calos da variedade SP 70-1143	69
2.	Crescimento da cultura de células em suspensão de cana-de-açúcar, var. SP 70-1143	74
3.	Proporção de células embriogênicas e indesejáveis em cultura de células em suspensão da var. SP 70-1143 (1ª e 9ª dias)	75
4.	Crescimento da cultura de células em suspensão da var. SP 79-1011	80
5.	Crescimento da cultura de células em suspensão da var. SP 79-1011, para os parâmetros peso fresco, peso seco, volume e número de células	82a

6.	Estruturas diferenciadas presentes em algumas culturas em suspensões, resultantes do fenômeno de rizogênese	87
6a.	Rizogênese em suspensões celulares heterogêneas, com presença de células tubulares	87
6b.	Detalhe da estrutura radicular mostrando eixo central e extremidade semelhante à coifa . . .	87
6c.	Corte histológico transversal mostrando alternância entre xilema e floema e presença de estrias de Caspary na endoderme, comuns em tecidos radiculares. (ver seta)	87
7.	Regeneração a partir de células em suspensão, var. SP 70-1143	100
7a.	Cultura heterogênea mostrando a presença de células tubulares, var. SP 70-1143	100
7b.	Cultura homogênea mostrando células arredondadas, em intenso processo de divisão (ver formação de lamela média nas setas) . . .	100
7c.	Possível pró-embrião formado de calos oriundos de suspensões celulares	100
7d.	Pró-embrião em estágio mais avançado de diferenciação	100
7e.	Planta diferenciada, com parte aérea bem formada.	100
7f.	Multiplicação das plantas em fase de enraizamento	100

8. Padrão de isolamento de protoplastos, var SP 79-1011, nas soluções enzimáticas, SE2 e SE3, descritas na Tabela 3	103
9. Isolamento e cultivo de protoplastos a partir de células em suspensão, var. SP 79-1011	115
9a. Cultura em suspensão homogênea, em intensa divisão, com 4 dias de subcultivo	115
9b. Protoplastos recém-isolados	115
9c. Protoplasto mostrando aumento de volume e corrente citoplasmática em direção ao núcleo	115
9d. Primeira divisão celular	115
9e, 9f e 9g. Formação de colônia	115
9h. Calos transferidos para meio fresco	115

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	- 6-benzilaminopurina
CPW	- Solução de nutrientes de FREARSON et alii (1973)
FDA	- Diacetato de fluoresceína
GM	- Meio de cultura descrito por CHEN (1986)
KM8p	- Meio de cultura de KAO & MICHAYLUK (1975)
MES	- Ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfônico
MS	- Meio de cultura de MURASHIGE & SKOOG (1962)
NAA	- Ácido naftalenoacético
N6	- Meio de cultura de CHU (1978)
PEG	- Polietileno glicol
R2	- Meio de cultura de OHIRA et alii (1973)
2,4-D	- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO E PROTOPLASTOS EM CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum* spp).**

Autora: MARIA CRISTINA FALCO

Orientador: PROF. DR. AUGUSTO TULMANN NETO

RESUMO

O trabalho teve por objetivo, adaptar metodologia de cultura de células em suspensão e protoplastos para variedades brasileiras comerciais de cana-de-açúcar, SP 79-1011 e SP 70-1143, de modo a possibilitar a utilização de técnicas avançadas de biologia celular e molecular nesta cultura. Para alcançar tal objetivo, foram desenvolvidas as seguintes atividades:

1) Obtenção de calos e seleção de condições adequadas de subcultivo que favorecessem o avanço das etapas propostas.

2) Obtenção da cultura de células em suspensão a partir de calos selecionados na etapa anterior. Ênfase maior foi dada à manutenção de suspensões celulares com características morfogênicas, objetivando a fase seguinte de isolamento de protoplastos e regeneração. Para isso, foram estabelecidas as curvas de crescimento da cultura, envolvendo

parâmetros como número de células, peso fresco, peso seco e volume do total de células. A determinação de tais curvas permitiu a localização dos picos de crescimento e a definição dos períodos ideais de subcultivo. A variável número de células foi a que melhor expressou o crescimento da cultura. Diferentes meios de cultivo foram avaliados, mais precisamente as doses de 2,4-D necessárias à manutenção da cultura por longo período de tempo. O meio MS, suplementado com 1.5 - 3.0 mg / l de 2,4-D, 500 mg / l de caseína hidrolisada e 5 % de água de coco, mostrou-se favorável.

3) A regeneração de plantas de suspensão celular teve por objetivo testar o material utilizado no isolamento de protoplastos quanto às suas características embriogênicas, bem como possibilitar a utilização futura de técnicas como biobalística. O meio MS mostrou-se capaz de regenerar plantas de suspensões com até 5 meses de subcultivos.

4) Isolamento de protoplastos a partir de calos e suspensões celulares, incluindo testes de diferentes soluções enzimáticas, diferentes métodos e diferentes idades de cultura, visando determinar aquelas que propiciassem maior rendimento em termos de isolamento, formação de colônias e microcalos. A solução de enzimas contendo 1 % de Celulase RS, 0.2 % de Pectolyase Y23, 5.0 mM de MES e sais de CPW com 13 % de manitol, mostrou-se muito eficaz no isolamento. Os meios

de cultura R2, N6 e GM foram capazes de formar microcalos.

5) A regeneração de plantas a partir de protoplastos, até o momento não foi alcançada.

**CELL SUSPENSION CULTURE AND PROTOPLAST IN SUGARCANE
(*Saccharum* spp).**

Author: MARIA CRISTINA FALCO

Adviser: Dr. AUGUSTO TULMANN NETO

SUMMARY

This work was carried out to study callus induction, cell suspension initiation and protoplast isolation and culture. Two cultivated sugarcane varieties were used namely SP 70-1143 and SP 79-1011. The following steps were accomplished:

(1) Selection of the best culture conditions to promote callus formation and support the next steps.

(2) Cell suspension culture were initiated and cells selected which would had cells with proper morphogenic characteristics to be used in protoplast isolation and plant regeneration. The selection of the best technique was supported by parameters obtained from number of cells, fresh and dry weight, and packed cell volume. The variable number of cells was the best expression to the cellular suspension growth. Different culture media were evaluated with emphasis on the 2,4-D dosages required for

long time duration of the cell culture. The MS culture medium with 1.5 to 3.0 mg / l of 2,4-D, 500 mg / l of hidrolysed casein and coconut milk (5 %) showed efficient.

(3) Plant regeneration from cell suspensions were tested to establish the conditions for the use of biobalistic techniques. The MS culture medium was able to regenerate plants in a cellular suspension until the period of five months.

(4) Protoplast isolation were studied using different enzymes with known methodologies and different culture age. The rates of isolation, colony and microcallus formation were recorded. The enzyme solution containing Cellulase RS (1 %), Pectolyase Y23 (0.2 %), EMS (5.0 mM) and CPW salts with manitol (13 %) as osmoticum yielded a good number of protoplasts. Calli derived from protoplasts were obtained in three different media, being R2 the best followed by N6 and GM.

(5) Plant regeneration from protoplasts. The work is in progress but no plant has been regenerated.

1. INTRODUÇÃO

As células e protoplastos são essenciais na manipulação genética de plantas através de biotecnologia. A transformação celular e a hibridação somática tornaram-se importantes caminhos para o melhoramento genético, possibilitando a combinação de espécies sexualmente incompatíveis e a transferência de genes em protoplastos, com uso de plasmídios (COCKING, 1981).

Para a cultura da cana-de-açúcar, essas técnicas assumem uma importância ainda maior, uma vez que a cultura apresenta dificuldades particulares na obtenção de variedades pelos métodos convencionais.

Culturas de células podem auxiliar o melhoramento genético pela facilidade de selecionar variantes ou transformantes obtidos pelas técnicas de transferência de genes. Mas, culturas totipotentes, capazes de rápido crescimento, são críticas para técnicas de transformação e hibridação (FITCH & MOORE, 1993) e a maioria das técnicas de transferência de genes em cana-de-açúcar depende da regeneração de plantas a partir de protoplastos transformados

(TAYLOR et alii, 1992a).

As Gramíneas têm se mostrado recalcitrantes no cultivo e regeneração de plantas "in vitro" (VASIL & VASIL, 1980). A falta de um sistema eficiente de regeneração de plantas a partir de células e protoplastos de cana-de-açúcar tem limitado os avanços das técnicas modernas de biologia celular. Sucessos como os de SRINIVASAN & VASIL (1986) e CHEN et alii (1988b) não foram repetidos nem mesmo pelos próprios autores, mostrando as dificuldades com essa cultura (TAYLOR et alii, 1992a).

No Brasil, são raros os estudos envolvendo o desenvolvimento dessas técnicas, em cana-de-açúcar. De maneira geral eles concentram-se em instituições como a COPERSUCAR, a UFSCar, o IAC e a ESALQ. Trabalhos de pesquisa com protoplastos de cana-de-açúcar foram iniciados no Brasil com MURAYAMA (1987) e desde então não surgiram novas publicações.

O objetivo deste trabalho é dar continuidade a esses estudos, encontrando metodologias viáveis de isolamento e cultivo de células e protoplastos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., cvs. SP 70-1143 e SP 79-1011), com ênfase maior às tentativas de regeneração de plantas a partir de calos, células e protoplastos, como forma de certificar a capacidade morfogênica desse material.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), um importante membro da família *Gramineae*, é responsável por cerca de 65% da produção de açúcar no mundo (HO & VASIL, 1983a). No Brasil ela assume importância ainda maior por ser matéria prima da produção de álcool, usado como combustível.

O Brasil, juntamente com Cuba e Índia, está entre os maiores produtores do mundo, alcançando cerca de 261 milhões de toneladas na safra de 1991, em uma área de mais de 4 milhões de ha (Anuário Estatístico do Brasil, 1992).

O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, chegando a 136 milhões de toneladas em 1991, numa área de 1.852.400 ha. A produção de açúcar para este estado ultrapassa os 3 milhões de toneladas e a de álcool chega a 8 milhões de m³ (Anuário Estatístico do Brasil, 1992).

O gênero *Saccharum* possui cinco espécies

distintas: *S. officinarum* L., *S. sinense* Roxb. e Jeswiet, *S. barberi* Jeswiet, *S. spontaneum* L., *S. robustum* Jeswiet (LIU, 1984), sendo que a maioria das variedades comerciais constitui-se de híbridos interespecíficos deste gênero, podendo ser descrita atualmente como aneuplóides complexos, devido ao alto grau de ploidia e origem interespecífica de seus ancestrais.

Os números cromossômicos das variedades cultivadas variam de $2n = 100$ a 130 (SREENIVASAN et alii, 1987), lembrando ainda que a cana-de-açúcar é descrita por muitos autores como sendo portadora de mosaicismo cromossômico, termo referente à variação nos números de cromossomos em um mesmo indivíduo. Esse fenômeno, segundo D'AMATO (1978), seria a expressão da instabilidade genética, muitas vezes associada à hibridação.

No melhoramento genético dessa cultura, o aumento nos teores de açúcar é certamente a maior prioridade, seguido de resistência a doenças, já que seu cultivo em regiões tropicais a torna vulnerável ao ataque de sérias doenças (LIU, 1984).

O melhoramento genético no Estado de São Paulo é realizado atualmente por poucas instituições de pesquisa, destacando-se o Instituto Agrônomo de Campinas, a COPERSUCAR e o IAA-Planalsucar, que teve suas funções

absorvidas pela UFScar (Universidade Federal de São Carlos).

Para maioria das doenças da cana-de-açúcar o melhor e mais viável método de controle é o uso de variedades resistentes, que geralmente são introduzidas após sérias epidemias. Foi assim com a epidemia do mosaico da cana-de-açúcar, ocorrida na década de 20 no Brasil (TOKESHI, 1980); com o carvão (*Ustilago scitaminea*), na região de Assis - SP, em 1946, que exigiu variedades resistentes na época (COPERSUCAR, 1985); e, mais recentemente, em 1979, nova epidemia de carvão por aumento indiscriminado das áreas de plantio da variedade Na 56-79, suscetível à doença (BERGAMIN FILHO et alii, 1987).

Além de resistência a doenças e de alta produção de açúcar, é necessário que as variedades comerciais apresentem resistência ao florescimento precoce, que reduz drasticamente a produção (PONCE, 1984).

Para PONCE (1984), a alta poliploidia das espécies envolvidas no melhoramento, a instabilidade dos cromossomos devido a aneuploidia e ao mosaicismo cromossômico, tornam muito difíceis os estudos genético básicos, assim como os trabalhos de melhoramento clássico; por isso trabalha-se com grandes populações segregantes, de modo que a eficiência de muitos programas de cruzamento, basicamente empíricos, seja baixa.

Existe um considerável número de variedades e clones que, embora possua bom comportamento agrícola e industrial, tem limitações como suscetibilidade a alguma doença, alta porcentagem de floração ou suscetibilidade à salinidade e à seca. Para estas variedades, a eliminação dos defeitos por meio de técnicas de cultivo "in vitro" se fazem de forma mais rápida e menos custosa que os métodos tradicionais de cruzamento (PONCE, 1984).

2.2. CULTURA DE TECIDOS EM CANA-DE-AÇUCAR.

2.2.1. Importância no Melhoramento Genético.

LIU (1984) comenta que as variedades comerciais de cana-de-açúcar são derivadas de germoplasma de 20 canas nobres e menos de 10 *S. spontaneum*. Isso mostra que a base genética da cana comercial é extremamente estreita, sugerindo que a variabilidade genética da cultura deve ser aumentada urgentemente.

NICKELL (1977) cita seis técnicas a nível celular, capazes de aumentar a diversidade genética: 1) Variação na cultura de células e tecidos, poliploidia, aneuploidia e mosaicismo cromossômico; 2) Indução de mutações; 3) Indução de poliploidia; 4) Obtenção de plantas

haplóides por cultura de pólen e antera; 5) Fusão de células vegetativas; e 6) Transformação.

A mais de 30 anos, NICKELL iniciou no Hawaí a cultura de células e tecidos de cana-de-açúcar, a partir de tecidos meristemáticos visando programas de melhoramento (LIU, 1984). A partir de então, inúmeros são os trabalhos descritos envolvendo as mais variadas técnicas e Institutos de pesquisa. Hawaí, Florida, Philipinas, Austrália, Brasil e França pesquisam técnicas de cultura de células e tecidos em cana-de-açúcar, paralelamente aos programas convencionais de cruzamentos.

Os recursos da cultura de tecidos permitem um ganho genético suplementar, visto como uma fonte de variabilidade adicional a ser explorada sob um esquema de seleção.

Assim, as técnicas de cultura de tecido podem ser vistas como ferramentas a serem utilizadas tanto para propagação clonal de variedades, associadas à limpeza de patógenos, como para a indução de variabilidade possível de ser aproveitada no melhoramento. Não se espera, é claro, que tais manipulações possam substituir as práticas convencionais de melhoramento (SILVAROLLA, 1989).

O uso das técnicas da cultura "in vitro" de órgãos, células e tecidos vegetais que, por extensão, podem

servir de base para o desenvolvimento da engenharia genética em plantas, contribui grandemente para o melhoramento vegetal, principalmente quando envolve abordagens a nível celular (CROCOMO, 1981).

Sistemas modelos de cultivo "in vitro" como os conseguidos para plantas do gênero *Nicotiana* estimularam a utilização de técnicas de cultura de tecidos e biologia molecular. Em tais sistemas conseguiu-se regeneração de plantas partindo de células isoladas e protoplastos, seleção de linhagens mutantes a partir de culturas de células, produção de híbridos somáticos entre espécies não relacionadas e finalmente transformação de células com DNA estranho e posterior regeneração das plantas geneticamente alteradas (SRINIVASAN & VASIL, 1986).

A adaptação dessas técnicas para cereais e gramíneas, continua sendo um sério problema devido a dificuldades surgidas na regeneração de plantas adultas partindo de células isoladas ou protoplastos e a inviabilidade de vetores para transformação de células e protoplastos (VASIL & VASIL, 1986).

Atualmente, muitas gramíneas já foram regeneradas a partir da cultura de protoplastos, mas esse processo ainda não é uma técnica rotineira. Técnicas como a biolística ou aceleração de partículas contendo DNA, e a

microinjeção surgem como fortes candidatas a solucionar tais problemas, uma vez que dispensam o uso de protoplastos (POTRYKUS, 1990).

2.2.2. Indução de Calos

Na maioria dos trabalhos publicados sobre cultura de calos de cana-de-açúcar o explante utilizado com maior sucesso é o segmento transversal do tecido jovem (HO & VASIL, 1983a; LOURENS & MARTIN, 1987; SREENIVASAN et alii, 1987; GUIDERDONI & DEMARLY, 1988; CHEN et alii, 1988a; KHAN et alii, 1984; IRVINE, 1984; PEROS & CHAGVARDIEFF, 1983 e 1987; IRVINE & BENDA, 1985; LIU, 1984) embora os calos possam ser obtidos de uma série de diferentes explantes cultivados "in vitro", como por exemplo, meristema apical ou de raiz, inflorescência e tecidos da região do nó (LIU, 1984).

Os meios de cultura utilizados sofrem algumas variações, mas basicamente recomenda-se o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com o regulador de crescimento 2,4-D (CHEN et alii, 1988a). KHAN et alii (1984) recomendam o meio MS acrescido de 2,4-D, tiamina, meso-inositol e água de coco, sendo este último ingrediente também recomendado por muitos outros autores.

Na literatura são descritos tipos distintos de calos formados em meio-de-cultura. CHEN et alii (1988a) descrevem a formação de três tipos morfológicamente distintos: um calo branco, compacto, capaz de regenerar plantas; um calo friável, não morfogênico e um terceiro tipo mucilaginoso, com possibilidade de reverter para os outros dois tipos, dependendo da concentração de 2,4-D no meio de cultura. GUIDERDONI & DEMARLY (1988), após exames histológicos, citam dois tipos de calos: nodular e friável, oriundos de diferentes regiões do explante e citologicamente diferentes. Esses autores relatam ainda que os calos nodulares foram obtidos da base de folhas jovens e os friáveis de folhas maduras, sendo que os primeiros são responsáveis pela regeneração via embriogênese somática.

LIU (1981), também baseando-se em estudos histológicos, afirma que os calos derivam de células do floema de um feixe vascular jovem. A hipótese de origem do calo de uma única célula tem sido sugerida, mas ainda não foi comprovada.

VASIL (1987) escreve que culturas de calos embriogênicos podem ser obtidas facilmente de embriões imaturos, inflorescências jovens e folhas, sendo que nestas os calos saem de células do mesófilo e da epiderme dos feixes vasculares. Segundo o autor, os calos embriogênicos

são caracteristicamente compactos, preferivelmente organizados e de cor branco e amarelo pálido; já os calos não embriogênicos aparecem moles e translúcidos.

Para HO & VASIL (1983a) os calos compactos são constituídos de células pequenas, arredondadas, com citoplasma rico e com capacidade de regeneração via embriogênese; os calos macios seriam constituídos de células grandes, alongadas e semi-translúcidas que ocasionalmente desenvolvem raízes; já os calos mucilaginosos teriam células alongadas, de natureza não embriogênica.

Foram observadas variações nas respostas de explantes foliares à indução de calos. Tais variações ocorriam em função de espécies, variedades e cultivares comerciais (CHEN et alii, 1988a). Estes pesquisadores citam vários fatores que afetam o controle, manutenção e regeneração de culturas de calos: genótipo, natureza do explante, concentração de 2,4-D, luz e condições de cultivo.

GUIDERDONI & DEMARLY (1988) atestam alta frequência de regeneração de calos nodulares, enquanto que calos friáveis raramente regeneram plantas.

A regeneração de plantas a partir de calos pode ocorrer via organogênese (LIU, 1981) ou via embriogênese somática (HO & VASIL, 1983a; CHEN et alii,

1988a). Após 30-35 dias do início da cultura, pode-se obter os embrióides, em meios de cultura contendo baixas concentrações de 2,4-D (HO & VASIL, 1983).

SRINIVASAN & VASIL (1986) também apontam duas vias de regeneração de plantas a partir de cultura de calos: a embriogênese somática e a organogênese.

LIU (1981) caracteriza a organogênese como o desenvolvimento de um pequeno nódulo verde de aproximadamente 1-1,5 mm na superfície do calo. Examinando este nódulo verificou-se tratar de meristema com primórdios foliares.

Para CHEN et alii (1988a), na maioria dos casos, em um mesmo calo ocorre simultaneamente regeneração via organogênese e embriogênese somática, existindo uma tendência para organogênese em culturas obtidas na luz.

Segundo os mesmos autores, a seleção visual de calos a cada subcultivo, a incubação no escuro e a alternância de baixas e altas concentrações de 2,4-D no meio, foram essenciais para manutenção dos calos morfogênicos. Usando tal método, a capacidade de regeneração de plantas foi mantida por mais de 30 meses após a indução de calos.

LIU & CHEN (1974) em estudo histológico da organogênese em calos, encontraram que os meristemóides se

desenvolviam em brotos sendo a parte aérea composta por estruturas semelhantes à plúmula e coleoptilo, como em embriões zigóticos, mas os autores não encontraram os demais componentes de um embrião típico de semente de gramínea, ou seja, eixo embrionário, radícula e coleorriza. Os autores identificaram dois padrões de diferenciação nos calos: em um apareciam brotos e mais tarde raízes e em outro, somente as raízes que eram incapazes de reverter em plantas.

Os embrióides - embriões somáticos morfológica e fisiologicamente similares aos embriões zigóticos - alcançam bipolaridade rápida e possuem um sistema vascular fechado (VASIL, 1987).

O cultivo de tecidos somáticos "in vitro" é apontado como uma forma de induzir variabilidade genética, aumentando assim a diversidade (CROCOMO, 1981).

LIU (1981) estudou a variabilidade genética em tecidos de cana-de-açúcar cultivados "in vitro", e fez uso de mutagênico químico EMS (Etil Metano Sulfonato) para induzir maior variabilidade.

Para LOURENS & MARTIN (1987) o processo de cultura de tecidos resultou em significativo aumento da variabilidade morfológica em plantas de alguns cultivares de cana-de-açúcar. Essa variabilidade se manifestou primeiramente na forma de hábito anormal de

crescimento, número de colmos, folhas, diâmetro de colmo, etc. Entretanto, a reversão para as características fenotípicas, originais de cultivares parentais foram evidentes no segundo ano de experimento, sugerindo que a maioria das variações surgidas nas culturas de tecidos não são controladas geneticamente.

Plantas regeneradas expressando variabilidade são comumente chamadas de variantes somaclonais. Os autores sugerem que as variabilidades observadas em seus experimentos possam ter sido causadas por desbalanço hormonal ou nutricional, ou outro tipo de stress.

A variação somaclonal tem sido explorada por vários pesquisadores, principalmente objetivando seleção de mutantes com características agronômicas favoráveis. SREENIVASAN et alii (1987) fazem uso da variação somaclonal em culturas de calos de cana-de-açúcar buscando mutantes resistentes à ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). PEROS & CHAGVARDIEFF (1983) testaram os efeitos tóxicos do carvão da cana-de-açúcar (*Ustilago scitamineae*) em calos de cana-de-açúcar. A cultura de calos também foi utilizada por IRVINE & BENDA (1985) buscando resistência ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar.

SILVAROLLA (1989) em sua dissertação sobre análise citológica de calos e plantas regeneradas in vitro de

cana-de-açúcar, faz uma interessante revisão sobre as condições que levam a variação somaclonal. Fatores como genótipo, fonte de explante, condições de cultura (com destaque para o análogo de auxina, 2,4-D) e duração da cultura, são cuidadosamente discutidos, bem como as bases genéticas da variação somaclonal.

IRVINE (1984) discutiu as variações verificadas em plantas regeneradas de cultura de tecidos, colocando em dúvida a persistência de tais variações. LIU (1987) faz referência ao uso de irradiações gama para induzir aumento na frequência de mutações em culturas de calos de cana-de-açúcar.

Outra forma de utilizar a cultura de calos, além dessas citadas acima, e talvez a de maior interesse na moderna biotecnologia é como explante para a cultura de células em suspensão (LIU, 1984; HO & VASIL, 1983b) e posterior isolamento de protoplastos (SREENIVASAN & VASIL, 1986; CHEN et alii, 1988).

2.2.3. Cultura de Células em Suspensão

2.2.3.1. Obtenção e Manutenção

Uma cultura em suspensão consiste de células e agregados de células dispersas e crescendo em um meio líquido, em agitação. Durante a incubação, a quantidade de material celular aumenta e esse aumento só ocorre até um limite quando a cultura atinge sua produção máxima. Se a cultura é diluída nesse ponto ou antes (por subcultivo), ela poderá ser continuamente propagada (STREET, 1977).

A cultura de células em suspensão tem sido utilizada para estudos fisiológicos, bioquímicos, morfológicos, mutacionais e patológicos (HO & VASIL, 1983b).

Para estabelecer suspensões deve-se empregar calos friáveis e altamente morfogênicos (LIU, 1984).

HO & VASIL (1983b) iniciaram suspensões com calos obtidos de folhas jovens, cortados em pequenos pedaços e colocados em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo meio MS líquido suplementado com 2-3 mg/l de 2,4 D, 5% de água de coco e 500 mg/l de caseína hidrolisada. Os frascos foram mantidos em agitador giratório à 100 rpm, em temperatura de 27-28 °C, no escuro.

GUIDERDONI (1985) iniciou suspensão inoculando

2 gramas de calo friável (2 repicagens) em 30 ml de meio MS com 30 g de sacarose, 1 mg/l de 2,4 D sob agitação de 110 rpm a uma temperatura de 25 ± 2 °C, em fotoperíodo de 16 horas.

AHLOOWALIA & MARETZKI (1983) utilizaram pedaços de calos de 12 semanas em frascos de 125 ml, contendo 50 ml de MS/2, suplementado com 0.5 mg/l de 2,4-D, em agitação à 150 rpm.

A água de coco, bem como a caseína hidrolisada, mostraram-se benéficas ao desenvolvimento de células de cana-de-açúcar, embora possam causar um certo escurecimento na cultura, facilmente eliminado por repetidos subcultivos (HO & VASIL, 1983b).

HO & VASIL (1983b) apontam como um dos fatores mais críticos no estabelecimento de suspensões celulares embriogênicas, a escolha dos calos a serem inoculados. Eles citam os calos compactos, opacos e brancos como sendo os que fornecem as melhores culturas, sendo indesejável a presença de calos leves e não morfogênicos.

De maneira geral, o método de iniciação de uma cultura em suspensão em cana-de-açúcar sofre pequenas variações de pesquisador para pesquisador, assim como a forma de manutenção da cultura. Um ponto em comum entre todos os trabalhos consultados é a manutenção dos frascos sob agitação e as trocas periódicas do meio de cultura acompanhada ou não

de subcultivos..

As culturas em suspensão são compostas basicamente por dois tipos de células: as células embriogênicas, pequenas, com citoplasma denso, núcleos proeminentes e visíveis grãos de amido, e as células não embriogênicas, grandes, vacuoladas, frequentemente alongadas, com poucos grãos de amido, não apresentando competência morfogênica (HO & VASIL, 1983b).

Segundo esses autores, pode-se selecionar as células embriogênicas tomando-se alíquota ao fundo de frascos em decantação, nos subcultivos realizados periodicamente.

KING (1984) recomenda um período de 1 a 2 semanas para as trocas de meio, mas o tempo exato e a diluição requerida devem ser determinados para cada linhagem de células. Diluições de 1:4, após uma semana e de 1:10, após 2 semanas são comumente utilizadas.

HO & VASIL (1983b) transferem 2.5 a 5.0 ml da suspensão para 35 ml de meio de cultura a cada 3 a 5 dias.

VASIL & VASIL (1986) recomendam manter intacta a cultura nos primeiros 7 a 10 dias e a partir de então, colocá-la para decantar por 1 minuto, descartar 10 a 15 ml do sobrenadante e recolocar igual volume de meio fresco, em intervalos de 3 a 5 dias. A técnica de descartar o sobrenadante ajuda a eliminar células grandes e vacuoladas,

consideradas não embriogênicas.

FUJIMURA & KOMAMINE (1984) relataram que a população de células de uma cultura em suspensão é geralmente heterogênea em tamanho e densidade. Para esses autores, as suspensões utilizadas em experimentos devem ser as mais homogêneas possíveis e o fracionamento físico é o mais eficiente método de obtenção de populações homogêneas.

Para VASIL & VASIL (1986), uma boa cultura de células é composta de algumas células alongadas, com finas paredes e uma grande população de células embriogênicas, que se apresentam pequenas, com rico citoplasma e sempre em pequenos grupos. O que determina a manutenção de suspensões embriogênicas é a taxa de divisões celulares - característica de cada espécie, a concentração de auxina no meio e o propósito específico para o qual a suspensão é requerida. Ela pode ser mantida por subcultivos com diluições de 1:2, com 4 a 7 dias de intervalo, entretanto, para isolamento de protoplastos, tanto a taxa de diluição como o tempo de subcultivo devem ser reduzidos (diluição de 1:5 a 1:7 a cada 4 a 5 dias).

Altos níveis de 2,4-D são inibitórios para o crescimento, mas baixas concentrações fazem com que as células cresçam rapidamente, tornando-se vacuoladas e com poucos grãos de amido. Concentrações entre 1 e 3 mg/l parecem

adequadas (VASIL & VASIL, 1986).

O exame da cultura ao microscópio é apresentado pelos diferentes autores como um dos parâmetros mais importantes na obtenção de uma boa cultura. Um pesquisador experiente faz alterações nas taxas de diluição e intervalos dos subcultivos, baseando-se apenas na condição da suspensão examinada ao microscópio.

Em FUJIMURA & KOMAMINE (1984), a separação das células por tamanho é realizada por peneiras de nylon ou metal e a separação por densidade, por centrifugação utilizando um polímero de sacarose, como por exemplo o Ficoll.

2.2.3.2. Quantificação do Crescimento

O crescimento em uma cultura de células em suspensão é normalmente medido pela contagem das células, determinação do volume total do conjunto de células ("packed cell volume"), e pelas determinações de peso fresco e peso seco das células (STREET, 1977).

Para a contagem de células, STREET (1977) recomenda uma prévia desagregação dos grumos com ácido crômico ou pectinase e contagem ao microscópio, em hemacitômetro.

KING (1984) recomenda o uso de uma seringa expelindo a suspensão vigorosamente, várias vezes para desmanchar os agregados.

Para determinação do volume, STREET (1977) recomenda a transferência de um volume conhecido da suspensão para tubo graduado de centrífuga, a uma velocidade de 2000 g / 5 minutos e expresso em ml de células / ml de suspensão (%).

Para a determinação do peso fresco, recomenda-se a coleta das células em peneira de nylon, lavagem com água estéril, retirada da água com vácuo, e pesagem em balança analítica. Para peso seco, uso de estufa por 12 horas, à temperatura de 60 °C, resfriamento em dessecador com sílica gel e pesagem. O peso seco é geralmente expresso em mg / ml de cultura ou por 10^5 células.

HO & VASIL (1983b), em seu trabalho sobre crescimento e regeneração de plantas de culturas de células em suspensão, utilizaram os parâmetros descritos acima para quantificar o crescimento e selecionar os meios de cultura mais adequados.

O número de células em suspensão aumenta rapidamente nos primeiros 4 dias, atingindo o máximo aos 8 dias, e podendo ocorrer a formação de embriões globulares na suspensão (AHLOOWALIA & MARETZKI, 1983).

PONCE (1984) obteve os mesmos resultados quanto ao tempo de multiplicação de suspensões e acrescenta que após o 8º dia, a suspensão decresce rapidamente. Assim, recomenda que os subcultivos não ultrapassem esse tempo. Resultados semelhantes foram encontrados por LIU (1984) e HO & VASIL (1983b).

Para avaliar a viabilidade das células, o azul de Evan mostrou-se efetivo, pois penetra nas células mortas, colorindo-as (PONCE, 1984).

LARKIN (1982) utilizou um colorímetro para quantificar o crescimento da suspensão celular, obtendo dados de densidade da suspensão. O pico ocorreu por volta do 14º dia.

2.2.3.3. Diferenciação

As suspensões celulares constituem um meio rápido de propagação clonal em larga escala, mas o mais importante é que podem ser utilizadas para selecionar variantes ou linhas de células mutantes, e atualmente constituem-se em uma das mais importantes fontes de protoplastos totipotentes em gramíneas (VASIL & VASIL, 1986).

A principal função da cultura de células em cana-de-açúcar é sem dúvidas fornecer material para

isolamento de protoplastos (VASIL, 1987; CHEN et alii, 1988).

O rápido crescimento e o fato de serem rigorosamente controladas aparecem como as principais vantagens das suspensões para EVANS & COCKING (1977), que citam ainda, o fácil acesso da solução enzimática, a sanidade do material e a manutenção das células em condições para isolamento e cultivo de protoplastos.

Mais difícil que a obtenção e manutenção das suspensões, é a regeneração de plantas a partir dela. Segundo PONCE (1984), o primeiro informe sobre regeneração de plantas a partir de suspensões foi feito por Heinz & Mae em 1971.

É controvertido o tempo que uma suspensão pode permanecer "in vitro" sem alterar sua capacidade de regeneração. LARKIN (1982) fala em 32 meses para calos, sem perda na capacidade de regeneração. Alguns autores citam uma possível perda dessa capacidade para culturas de células com mais de 1 ano. HO & VASIL (1983b) falam em suspensões com até 2 anos sem perder a habilidade morfogênica e citam comunicado de até 6 anos.

CHEN et alii (1988b) não forneceram a idade da suspensão celular utilizada no isolamento de protoplastos, os calos utilizados para iniciá-la datavam de 12 meses.

GNANAPRAGASAM & VASIL (1990), tratando das desvantagens de se manter culturas de células por longo

período, citam o intenso trabalho com manutenção e a possível redução na capacidade morfogênica da cultura. Para minimizar esse risco e manter a fidelidade genética e a habilidade de síntese de metabólitos secundários, devem ser iniciadas frequentemente novas culturas, uma prática também trabalhosa. Para solução desses problemas, os autores utilizaram a técnica de criopreservação de culturas celulares totipotentes. Nesse trabalho, foram iniciadas suspensões celulares com calos de 1 mês e só após 12 meses foram obtidas suspensões homogêneas.

É clássico o trabalho de HO & VASIL (1983b) que trata da regeneração de células em suspensão via embriogênese somática, em cana-de-açúcar. Para regenerar plantas dessas culturas, 1 ml de suspensão de 6 a 10 dias foi transferido para meio sólido em placas de Petri contendo diferentes concentrações de água de coco, caseína hidrolisada, zeatina, benziladenina, 2,4-D e carvão ativado. A incubação foi no escuro, à temperatura de 27°C. Os embriões formados foram transferidos para outros meios de cultura.

AHLOOWALIA & MARETZKI (1983) também tratam da regenerações em cana-de-açúcar, via embriogênese somática, mas só a partir de calos. As tentativas com células em suspensão não mostraram diferenciação.

GNANAPRAGASAM & VASIL (1990) citam os meios MS0

(MS com 3% de sacarose), MSB (MS0 com 1 mg/l de BAP) e MSSR (MS0 com 0.13 mg/l de 2,4-D, 0.25 mg/l de BAP, 0.25 mg/l de cinetina e 0.25 mg/l de zeatina) como capazes de promover regeneração de plantas de suspensões celulares. No meio MSB, houve formação de brotos em 4 semanas, quando então foram transferidos para o mesmo meio para melhorar o seu desenvolvimento. Após 4 semanas, foram transferidos para meio de enraizamento. No meio MSSR, embora tenha havido maior número de brotos, foram necessários 3 meses no mesmo meio de cultura, pois o crescimento era consideravelmente mais lento. O carvão ativado não deu bons resultados nesse trabalho.

FITCH & MOORE (1990) compararam o efeito de duas auxinas na manutenção de culturas totipotentes em cana-de-açúcar: 2,4-D e picloran. Os autores destacam dois tipos de tecidos em culturas de calos: um branco, não regenerativo, e um verde, regenerativo. Segundo eles, a proporção desses tecidos varia em função do tempo de cultura, genótipo e quantidade e tipo de auxina. Para culturas de rotina, os calos foram iniciados em meio MS com 3 mg/l de 2,4-D e a partir de 2 a 3 semanas os subcultivos foram feitos em meio MS com 0.5 mg/l de picloran e seleção de calos verdes que regeneraram grande número de plantas após mais de 4 anos. Para as suspensões celulares, 0.5 mg/l de picloran em meio MS, garantiram a totipotência por 19 meses. Os autores

concluem pela superioridade do picloran para manutenção da totipotência.

Contrariando o trabalho acima, TAYLOR et alii (1992a) afirmaram que as suspensões celulares contendo dicamba ou picloran produziram mais compostos orgânicos, presumivelmente fenóis, do que culturas contendo 2,4-D. As culturas crescendo com picloran e dicamba morreram após 9 a 15 semanas, respectivamente, a despeito de trocas regulares de meio de cultura.

FITCH & MOORE (1993), tratando do tempo de manutenção da capacidade embriogênica da cultura "in vitro" de cana-de-açúcar, chegaram a resultados diferentes para calos e células. Enquanto os calos mantiveram-se por mais de 16 meses, as suspensões foram totipotentes por apenas 8 meses, sendo que o número de plantas regeneradas diminuiu com o tempo de cultivo a partir do 5º mês.

TAYLOR et alii (1992a), tratando da produção de protoplastos de suspensões celulares, separa-as em 3 estágios diferentes. Em um primeiro estágio estão os calos em adaptação para meio líquido, desagregando-se; no segundo estágio teriam uma suspensão heterogênea, após 5 a 8 semanas de cultivo; no terceiro, o desenvolvimento de uma suspensão homogênea, após 10 a 14 semanas. Plantas foram regeneradas apenas das suspensões heterogêneas, mas a produção de

protoplastos foi maior nas suspensões homogêneas (3.4 a 5.2×10^6 protoplastos / g de peso fresco) quando comparadas com as suspensões heterogêneas (0.1×10^6 protoplastos / g de peso fresco). O processo de reciclagem dos calos obtidos de suspensões homogêneas para meio líquido aumentou a produção de protoplastos para 9.4×10^6 protoplastos / g de peso fresco.

Quanto às vias de diferenciação, valem as mesmas observações feitas para a cultura de calos.

2.2.4. Cultura de Protoplastos

2.2.4.1. Hibridação e Manipulação Genética

Um dos mais importantes avanços da biotecnologia de plantas foi o desenvolvimento de técnicas de isolamento, cultivo e fusão de protoplastos (VASIL & VASIL, 1980). Esses procedimentos, seguidos da regeneração de plantas, torna possível a obtenção de híbridos somáticos pela fusão de protoplastos e a transferência de organelas, DNA, etc. para modificação genética (VASIL, 1987).

A fusão de protoplastos não é limitada para a mesma espécie e pode ser facilmente conseguida entre duas espécies, independente das relações taxonômicas. Entretanto,

devido às sérias dificuldades na regeneração de protoplastos de cereais e gramíneas, poucos resultados têm sido obtidos com híbridos somáticos, o que levou alguns autores a utilizar hibridação com espécies de dicotiledôneas (VASIL, 1987).

PONCE (1984) cita a fusão de protoplastos de genótipos de cana-de-açúcar que não florescem com aqueles de boas características agronômicas, mas com florescimento, como uma alternativa para solucionar o problema.

Para CHEN et alii (1989), a produção de híbridos somáticos entre espécies diferentes - heterocários - pode ser vantajosa desde que envolva a transferência de um número pequeno de genes de um parental para outro. Esses pesquisadores obtiveram aproximadamente 2.000 heterocários de cana-petúnia por eletrofusão.

Existem relatos das vantagens da eletrofusão sobre a fusão química, principalmente quando em larga escala. A principal desvantagem, apontada pelos autores, do uso do PEG como fusogênico, é a alta aderência dos protoplastos à placa, levando-os à morte (CHEN et alii, 1989).

Os cultivares comerciais de cana-de-açúcar são um complexo de híbridos poliplóides interespecíficos que torna o melhoramento comercial de cultivares uma prática demorada e custosa. A possibilidade de corrigir um simples defeito em um cultivar elite é de grande valor, mas

praticamente impossível pelos métodos tradicionais de melhoramento.

As técnicas de engenharia genética podem ser facilmente utilizadas para solucionar este problema, e são particularmente atrativas pelas facilidades de manter e propagar vegetativamente os clones desejáveis. Entretanto, o desenvolvimento de um sistema eficiente de transformação genética é um pré-requisito para a engenharia genética em cana-de-açúcar (RATHUS & BIRCH, 1992).

A maioria das técnicas de transferência direta de genes dependem da regeneração de plantas transformadas de protoplastos. Para gramíneas, têm sido poucos os sucessos obtidos devido às dificuldades de regeneração (TAYLOR et alii, 1992b).

SRINIVASAN & VASIL (1986) e CHEN et alii (1988b), pesquisadores de sucesso na regeneração de plantas através de protoplastos, citam como dificuldades neste sistema, a produção de protoplastos de boa qualidade e a regeneração de plantas.

SUGIMOTO et alii (1992) também discutem as dificuldades de regeneração de plantas de protoplastos e citam apenas 3 trabalhos de sucesso neste intento: MARETZKI & NICKELL, 1973 (não consultado e pouco citado por outros autores), SRINIVASAN & VASIL (1986) e CHEN et alii (1988).

Os dois últimos trabalhos citados, têm sido a base para a manipulação genética dessa importante cultura. A partir deles é que os grupos de CHEN e de RATHUS têm dado sequência aos estudos de transformação via eletroporação de protoplastos e bombardeamento com microprojétil em células em suspensão (CHOWDHURY & VASIL, 1992).

2.2.4.2. Isolamento de Protoplastos

Para a grande maioria dos trabalhos com isolamento de protoplastos, os mesmos provêm de células do mesófilo de tecidos foliares. Entretanto, o mesmo não ocorre em cana-de-açúcar, onde os protoplastos são isolados de células embriogênicas em suspensão (VASIL, 1987).

Fracassos nas tentativas de isolamento de protoplastos de mesófilo, em gramíneas, levaram a precipitadas conclusões sobre a existência de bloqueios em protoplastos de cereais e a sugestão de incapacidade de divisões mitóticas (VASIL, 1987).

KRISHNAMURTHI (1976) descreveu brevemente os procedimentos adotados para isolamento, fusão e regeneração de protoplastos, mas não apresentou resultados de regeneração de plantas. Para isolamento a partir de mesófilo, a solução de enzimas era composta de Celulase R10 (4%), Macerozyme R10

(1%), Pectinase (1%) e estabilizadores de membrana.

EVANS et alii (1980) reportaram divisões celulares obtidas de protoplastos isolados de mesófilo da variedade Na 5679. Mas, segundo SRINIVASAN & VASIL (1986) e VASIL (1987), é provável que tal progresso seja inconsistente e devido à presença de células que não tiveram suas paredes celulares digeridas pela solução de enzimas.

LARKIN (1982) obteve colônias de células de protoplastos obtidos de células em suspensão tratadas com Driselase (2%), Cellulysin (2%), Hemicelulase (1%), Pectolyase (0.1%), sacarose (0.27 M), manitol (0.12 M) e CaCl_2 (0.024 M).

GUIDERDONI (1985) obteve protoplastos de calos friáveis e de suspensões celulares usando solução de enzimas contendo Pectolyase Y23, Driselase Fluka e Celulase Onozuka R10.

O trabalho clássico de SRINIVASAN & VASIL (1986) relata a neoformação de plantas a partir de protoplastos isolados de suspensões embriogênicas com 2 a 4 meses, utilizando uma solução de enzimas (25 ml em 1.5 g de peso fresco de células) composta de Celulase Onozuka RS (2%), Pectinase Sigma (0.2%), Driselase Kyowa Hakko (0.1%), Macerozyme Calbiochem (0.2%), manitol (0.2 M), sorbitol (0.2 M), MES (3 mM) e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 5.9. A incubação foi feita em

agitador giratório por 5 horas a 60 rpm, à temperatura de 27 °C. A quantidade de Celulase RS foi reduzida para 1% quando a incubação se estendeu por 16 horas, à 15 °C, após 1 hora inicial à 27 °C. Após filtragem em peneira de 100 e 25 µm, os protoplastos foram lavados 3 vezes por centrifugação à 100 x g por 3 a 5 minutos, em meio KM8p, descrito por GILMOUR et alii (1989).

MURAYAMA (1987), em sua dissertação sobre isolamento, cultivo e fusão de protoplastos de cana-de-açúcar, faz menção a outros trabalhos sobre o assunto. A autora descreve isolamento através de plantas cultivadas "in vitro" e em sala de crescimento, de calos friáveis e nodulares, e a partir de suspensões celulares. Foram testadas várias soluções enzimáticas, sendo os principais componentes, a celulase, a hemicelulase e a pectinase. As maiores produções de protoplastos, bem como a formação de microcalos, ficaram a cargo das suspensões celulares. Não há relato de regeneração de plantas.

CHEN et alii (1987), já trabalhando com transformação de protoplastos de cana-de-açúcar, utilizaram para isolamento, 60 ml de uma suspensão de 4 a 6 dias (cerca de 4 g de peso fresco de células), incubadas em 45 ml de solução enzimática, por 16 a 20 horas. O rendimento foi de 10 a 50 x 10⁶ protoplastos e cerca de 60 colônias se

desenvolveram em gotas de agarose.

No outro trabalho bem sucedido com a regeneração de plantas a partir de protoplastos, CHEN et alii (1988b) utilizaram suspensões de 3 meses, subcultivadas semanalmente.

Cerca de 3 gramas de células compactadas de 6 dias foram incubadas em uma solução enzimática contendo Meicelase P (2%), Rhozyme HP 150 (2%), Macerozyme R10 (0.03%), manitol (13%) e sais de CPW, pH 5.8. A incubação por 16 a 24 horas deu-se em agitador à 35 rpm, sob luz fluorescente. Após esse período, a suspensão passou através de peneira de 64 e 30 μm e os protoplastos foram lavados em CPW 13 % (sais de CPW, 13 % de manitol e 7.4 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Em 1989, CHEN et alii repetiram isolamento para eletrofundir protoplastos de cana-de-açúcar com protoplastos de petúnia, esperando que a capacidade de regeneração da petúnia fosse transferida para cana-de-açúcar. A cultura de células de cana, na ocasião, datava de 5 anos.

CHOWDHURY & VASIL (1992), trabalhando com bombardeamento de células em suspensão e eletroporação de protoplastos, utilizaram 5 ml de suspensão celular para 50 ml de solução enzimática (2% de Celulase RS, 1 % de Pectinase e 0.05% Pectolyase Y23) contendo 0.6 M de manitol, 5 mM de

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mM de meso-inositol, 0.7 mM de NaH_2PO_4 e 3 mM de tampão MES, pH 5.9. A incubação levou 16 horas, à 50 rpm.

RATHUS & BIRCH (1992), estudando as condições de otimização de eletroporação de protoplastos de cana-de-açúcar, trabalharam com suspensões celulares obtidas de segunda transferência de calos não morfogênicos, denominadas de linhas SP, que garantiram alta produção de protoplastos. O método de isolamento utilizado foi o descrito por SRINIVASAN & VASIL (1986).

SUGIMOTO et alii (1992), descrevendo um método simples para a formação de calos morfogênicos de protoplastos, utilizaram para isolamento, células em suspensão de 10 a 40 dias (calos de 6 a 10 meses), células em suspensão originadas de calos com 2 a 3 meses, e diretamente de calos de 2 a 3 meses. A solução de enzimas para os 3 casos continha 4% de Celulase Onozuka RS, 2% de Macerozyme R10, 0.35 mM de KH_2PO_4 , 3 mM de CaCl_2 , pH 5.5. Pressão osmótica mantida por 0.7 M de manitol. Incubação por 4 a 11 horas, à 32 °C, à 30 ou 60 rpm.

TAYLOR et alii (1992a), que compararam as produções de protoplastos e a capacidade de regeneração de plantas de 3 tipos de suspensões celulares, utilizaram como solução enzimática aquela descrita por SRINIVASAN & VASIL (1986). A maior produção foi conseguida com a suspensão de

calos obtidos da suspensão homogênea (10 a 14 semanas), embora nesse estágio não tenha havido regeneração de plantas como na suspensão heterogênea (5 a 8 meses). A produção de protoplastos para as suspensões que tiveram duas passagens pela fase de calos foi de 6.4 a 13.2×10^6 protoplastos / g de peso fresco de células.

TAYLOR et alii (1992a) estudaram os fatores que afetam o isolamento e a regeneração de plantas de protoplastos descritos no trabalho citado acima.

2.2.4.3. Cultivo de Protoplastos

Por cultivo de protoplastos entende-se o processo pelo qual ocorre a regeneração da parede celular, a divisão celular e o contínuo crescimento (FITTER & KRIKORIAN, 1982).

O meio de cultivo deve ser determinado para cada sistema, com variações na composição de sais minerais, vitaminas, agentes estabilizadores, fonte de carbono, ácidos orgânicos e reguladores de crescimento.

O cultivo pode se dar em meio semi-sólido ou líquido, havendo muitas variações de autor para autor. Variações também são encontradas na densidade ideal de protoplastos e nas condições físicas como luz e temperatura.

O cultivo em meio líquido, disposto em pequeno volume em placas de Petri, foi utilizado ou testado por LARKIN (1982), SRINIVASAN & VASIL (1986), CHEN et alii (1988b), CHOWDHURY & VASIL (1992) e SUGIMOTO et alii (1992).

O cultivo em meio semi-sólido, usando agarose, seja em fina camada ou em gotículas de 30 a 50 μ l, na base ou na tampa da placa, banhada ou não por meio líquido, parece ser o mais comum para cultivo de protoplastos de cana-de-açúcar. Trabalhos como os de EVANS et alii (1980), LARKIN (1982), LIU (1984), GUIDERDONI (1985), SRINIVASAN & VASIL (1986), CHEN et alii (1987, 1988b, 1989), CHOWDHURY & VASIL (1992), RATHUS & BIRCH (1992), SUGIMOTO et alii (1992) e TAYLOR et alii (1992a e 1992b), empregaram esse método.

O meio de cultivo largamente empregado, com ou sem variações é o de KAO & MICHAYLUK (1975). Também os meios MS, AA, B5 e N6 têm sido testados com modificações quanto aos reguladores de crescimento (SUGIMOTO et alii, 1992).

As densidades de cultivo são também bastante variadas. São encontrados na literatura, valores como 10^3 a 10^4 protoplastos / ml (EVANS et alii, 1980), 10^5 / ml (GUIDERDONI, 1985), $4-7 \times 10^5$ / ml (SRINIVASAN & VASIL, 1986), 3×10^5 / ml (CHEN et alii, 1988b), $0.1-1 \times 10^5$ / ml (SUGIMOTO et alii, 1992) e 5×10^5 / ml (TAYLOR et alii, 1992a e 1992b).

O uso de células ou protoplastos como forma de

auxiliar o cultivo de protoplastos - cultura "nurse" ou "feeder", também já foi tentado por LIU (1984), que utilizou uma fina camada de meio separada por polyester (mesh de 10 μm) do meio semi-sólido com os protoplastos. CHEN et alii (1989) utilizaram como "nurse", protoplastos de cana-de-açúcar para cultivo de heterocários de cana-petúnia.

A redução na osmolaridade durante o cultivo de protoplastos não é uma prática obrigatória na cultura da cana-de-açúcar. SUGIMOTO et alii (1992) afirmaram que o uso do meio AA dispensa essa prática. SRINIVASAN & VASIL (1986) obtiveram sucesso com o cultivo de protoplastos, sem realizar redução progressiva da pressão osmótica. Já CHEN et alii (1987, 1988b e 1989) utilizaram essa prática semanalmente, sendo essa redução, gradual e progressiva. O meio líquido é removido da placa e é adicionado uma mistura de meio para protoplasto e meio para células (KM8p e KM8), nas proporções de 2:1, 1:1 e 1:2, até a completa eliminação do meio para protoplastos.

Os testes de viabilidade são comuns antes de iniciar o cultivo. Normalmente, uma pequena alíquota da suspensão de protoplastos é tratada com FDA e observada ao microscópio de fluorescência. O Calcoflúor White é utilizado para verificar a ressíntese da parede celular (CHEN et alii, 1988b; RATHUS & BIRCH, 1992).

LARKIN (1982) fornece dados sobre a eficiência de plaqueamento: 19% dos protoplastos plaqueados tiveram primeira divisão e 5% chegaram a formar colônias. Já CHEN et alii (1987) obtiveram cerca de 60 colônias por gota, o que sugere uma eficiência da ordem de 0.5%.

2.2.4.4. Regeneração de Plantas

Como já foi descrito anteriormente, são raros os trabalhos com protoplastos em cana-de-açúcar que atingiram o estágio de regeneração de plantas.

TAYLOR et alii (1992a e 1992b), revisando o assunto, escreveram que em cana-de-açúcar, SRINIVASAN & VASIL (1986) regeneraram 5 plantas de protoplastos do cv. B4362, derivados de culturas de células em suspensão com idade de 2 a 6 meses, e que CHEN et alii (1988) regeneraram plantas de protoplastos derivados de culturas de células embriogênicas do cv. F164; mas que ambos os grupos foram incapazes de repetir seus próprios sucessos.

VASIL (1987) explica os insucessos nas tentativas de regeneração de plantas a partir de protoplastos pelo uso de culturas de células não morfogênicas, logo, os calos derivados de seus protoplastos fracassam na formação de plantas. Para esse autor, as mudanças na composição dos

nutrientes do meio de cultura e outros parâmetros não são cruciais, pois o fator mais crítico para esse propósito foi o uso de uma suspensão celular predominantemente embriogênica e de rápido crescimento.

SRINIVASAN & VASIL (1986) descrevem a regeneração de plantas via embriogênese somática. Dois a quatro dias após o plaqueamento, os protoplastos regeneraram parede, alongaram-se e iniciaram divisão. Pequenas colônias foram formadas em 10 a 14 dias, e em 4 a 6 semanas, calos compactos e translúcidos foram obtidos. Tais calos foram transferidos para meio MS semi-sólido, contendo 1% de carvão ativado e 0.25 - 1.0 mg/l de 2,4-D, com ou sem citocinina. Todos os calos compactos e cerca de 50% dos calos translúcidos produziram embriões somáticos em 2 semanas. Esses embriões foram transferidos para meio com 0.5 mg/l de BA ou com outros reguladores. Várias plantas verdes foram obtidas, assim como algumas albinas. Cinco plantas verdes foram transferidas para solo.

CHEN et alii (1988b), após redução da osmolaridade (cerca de 1 mês), transferiram os pedaços de meio e as gotículas com as colônias para meio MS com 0.9 mg/l de tiamina, 50 mg/l de caseína hidrolisada, 1 mg/l de 2,4-D, 5 % de água de coco e 30 g/l de sacarose (M36), por 4 semanas e depois para o mesmo meio , mas com 3 mg/l de 2,4-D, por 6

semanas. Os calos brancos e compactos foram então transferidos para o meio anterior (M36), suplementado com carvão ativado (1 g/l), e mantidos no escuro por 4 semanas. Após 2 semanas, transferência para luz. Os brotos foram inoculados em meio de enraizamento e depois para casa de vegetação.

Estudos histológicos confirmaram que a regeneração de plantas ocorreu via organogênese e não por embriogênese somática. Os autores ainda esclarecem que a transferência das culturas para M36 com carvão ativado, diretamente para a luz, resultam apenas em rizogênese.

A necessidade de atenção particular para a fonte de material é enfatizada pelos autores que recomendam ainda, o uso de calos morfogênicos com menos de 12 meses (idade das culturas utilizadas por eles) para estabelecer suspensões celulares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos conduzidos na Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Campus "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP.

3.1. CULTURA DE CALOS

3.1.1. Obtenção e Cultivo de Calos

3.1.1.1. Variedades utilizadas

Foram utilizadas duas variedades comerciais de cana-de-açúcar como fonte de tecidos para iniciar a cultura de calos: a variedade SP 70-1143, pelas boas características agronômicas e a variedade SP 79-1011, pelo bom desenvolvimento "in vitro", comumente observado.

Esse material vegetal foi fornecido pela COPERSUCAR - Piracicaba / SP, na forma de palmitos oriundos de plantas jovens (6 a 12 meses), cultivadas em canteiros.

Após retirada das folhas externas, os palmitos restantes, com cerca de 15 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, foram superficialmente desinfectados em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2 % ("Q-bona") misturada a igual volume de água, em agitação por 20 minutos. As demais folhas foram removidas em condições assépticas, após três lavagens em água destilada e esterilizada. As últimas folhas que compunham o palmito, com cerca de 0.8 cm, foram seccionadas transversalmente em fatias de cerca de 3 mm.

Experimento 1

Os segmentos transversais foram então inoculados em meios de cultura semi-sólidos (M0, M1, M2, M3 e M4), descritos na Tabela 1, em placas de Petri de 9 cm.

Tabela 1. Suplementos adicionados ao meio basal de MS para indução de calos e suspensões celulares de cana-de-açúcar.

Componentes	Concentração (mg/l) e Designação do meio				
	M0	M1	M2	M3	M4
2,4-D	-	1.0	2.0	3.0	3.0
caseína hid.	500	500	500	500	-
água coco* (%)	5.0	5.0	5.0	5.0	-

Para meio semi-sólido, adição de 0.8% de agar Difco.

* Água de coco filtrada e autoclavada com o meio de cultura.

O experimento constou de 8 repetições (placas) para cada variedade, sendo 5 segmentos por placa.

As culturas foram mantidas no escuro, à temperatura de 27 ± 2 °C.

3.1.1.2. Manutenção das culturas

Após a obtenção dos calos (cerca de 1 mês) e avaliação do tipo e quantidade de calos produzidos nos diferentes meios de cultura, os mesmos foram transferidos para meio fresco, a cada 30-35 dias.

Esse material foi sendo utilizado ao longo do tempo para ensaios de regeneração, obtenção de suspensões celulares e isolamento de protoplastos. No decorrer dos ensaios, também foram iniciadas novas culturas de calos para manutenção de suas características morfogênicas.

3.1.2. Regeneração de plantas a partir de calos

Experimento 2

Os calos das duas variedades, formados após 3 repicagens (4 meses), foram separados em dois tipos: um nodular, compacto e de cor branco opaco - tipo I, e outro mais friável e translúcido - tipo II. Ambos foram inoculados em pequenas porções, em placas de Petri contendo os seguintes

meios de cultura: MR0, MR1 e MR4, descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Suplementos adicionados ao meio basal de MS para regeneração de plantas em cana-de-açúcar.

Componentes	Concentração (mg/l) e Designação do meio								
	MR0	MR1	MR2	MR3	MR4	MR5	MR6	MR7	MR8
caseína hid.	-	500	-	-	-	400	-	-	500
água coco (%)	-	5.0	-	-	-	-	-	-	5.0
2,4-D	-	-	-	1.0	-	-	-	1.0	-
BAP	-	-	.25	.25	1.0	-	-	-	-
NAA	-	-	-	-	-	1.0	1.0	-	-
cinetina	-	-	.25	.25	-	1.63	1.0	-	-
zeatina	-	-	.25	.25	-	-	-	-	-
carvão ativ.	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0

Para meio semi-sólido, adição de 0.8% de agar Difco.

O experimento constou de 5 repetições, sendo 5 porções (com cerca de 1 cm de diâmetro) por placa. As placas permaneceram em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 12 horas à temperatura de 27 ± 2 °C.

Após o aparecimento de estruturas verdes, estas foram separadas, quando possível e inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MR0 para o completo desenvolvimento da parte aérea, sendo então transferido para MS/2 (MS na metade da concentração de sais e vitaminas) para o enraizamento.

3.2. CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

3.2.1. Obtenção e Manutenção da Suspensão Celular

Experimento 3

Calos das duas variedades, obtidos após 3 subcultivos, foram utilizados para iniciar suspensões celulares. Porções selecionadas de cerca de 3 g de calos embriogênicos e porções não selecionadas foram inoculadas em 25 ml de meio de cultura M0, M1, M2, M3 e M4 condicionados em frascos do tipo Erlenmeyer, de 250 ml, sendo dois frascos por tratamento.

A incubação foi feita em agitador orbital (VKS 75, Edmund Bühler - 7400 Tübingen), à 100 rpm, em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 2 °C, no escuro.

Após uma semana, o meio foi substituído por meio fresco, após 5 minutos de decantação, com o auxílio de uma pipeta. Nos próximos 30 dias trocou-se o meio de cultura a cada 5 dias visando minimizar o acúmulo de substâncias fenólicas, possivelmente tóxicas às células.

A partir de então, os resíduos de calos que não se desagregaram foram retirados da cultura que passou a ser mantida por subcultivos semanais e com volume no frasco de cerca de 30-40 ml.

3.2.2. Quantificação do Crescimento

Várias tentativas foram feitas para a determinação das curvas de crescimento da cultura de células em suspensão. A seguir, será descrito uma sequência de três experimentos que foram decisivos para o alcance deste objetivo.

Experimento 4

A suspensão celular da variedade SP 70-1143, utilizada como matriz, tinha aproximadamente 5 meses de subcultivo, com troca de meio de cultura em intervalos de 7 dias, por decantação e descarte do sobrenadante. A cultura apresentava-se bastante homogênea quanto às células embriogênicas (pequenas, arredondadas e com citoplasma denso).

A concentração de células na suspensão matriz era de 1.07×10^5 células / ml. Foram transferidos 5 ml desta cultura para 6 frascos contendo 25 ml de meio de cultura M3. Destes 6 frascos, 3 receberam trocas diárias de meio de cultura e 3 não tiveram trocas. As trocas eram feitas por decantação das células em tubos de ensaio por 20 minutos, retirada de 15 ml do sobrenadante com auxílio de uma pipeta, e adição de mesmo volume de meio fresco.

Por 9 dias, foram retiradas 10 gotículas de

2 μ l do meio de cada frasco (pipeta automática) por dia e colocados em placas de Petri, contendo fina camada de meio de cultura (o suficiente para impedir que a suspensão secasse e permitir a focalização no microscópio invertido, onde eram realizadas as contagens das células).

O objetivo das trocas diárias nos 3 frascos era verificar se a mesma contribuía para aumentar o número de células embriogênicas.

A testemunha (3 frascos) só foi contada no 1º e no 9º dia, não sendo manipulada entre esses dias.

Experimento 5

Culturas de células em suspensão de cana-de-açúcar, var. SP 79-1011, obtidas e mantidas pelo mesmo método descrito no experimento anterior, foram utilizadas nessa nova etapa de quantificação do crescimento.

A matriz tinha cerca de 3 meses de subcultivos e apresentava uma concentração de 2.4×10^5 células / ml (estimada por contagem de amostras em hemacitômetro).

Cinco ml dessa cultura foram inoculados em frascos contendo 25 ml de meio de cultura M3, num total de 24 frascos, correspondendo a 6 avaliações (1 a cada 2 dias), sendo 4 repetições (frascos) por tratamento (dias de avaliação).

Para as contagens do número de células o

procedimento foi o mesmo descrito no experimento anterior, sendo que aqui foram inoculadas 5 gotículas / placa.

Para obtenção de peso fresco, 27 ml de cada cultura foram filtrados utilizando papel de filtro Milipore AP 15, 42 mm de diâmetro, à vácuo, até que todo meio de cultura passasse pelo filtro. Pesou-se em balança analítica.

Para obtenção do peso seco, os mesmos filtros com as células foram levados à estufa à 60 °C, até atingir peso constante (cerca de 2 horas), sendo então pesados.

Experimento 6

Corresponde ao experimento definitivo de quantificação de crescimento da variedade SP 79-1011, que inclui as três fases da curva de crescimento. Inclui ainda, um novo parâmetro de avaliação: o volume da massa celular ("PCV"), medido em porcentagem de volume.

A suspensão celular utilizada como matriz apresentava 4 meses de subcultivos e cerca de 4.23×10^6 células / ml (bem mais concentrada que a do experimento anterior, que possuía apenas 2.4×10^5 células / ml).

Cinco ml dessa cultura foram inoculados em frascos contendo 25 ml de meio de cultura (o mesmo utilizado na manutenção), num total de 51 frascos, correspondendo a 17 avaliações (1 a cada 2 dias até o 18º dia, e 1 a cada 4 dias até o 46º dia), sendo 3 repetições (frascos) por tratamento.

Para as contagens do número de células embriogênicas, o procedimento foi o mesmo descrito anteriormente, mas agora com diluições para facilitar as contagens e assegurá-las até o final do experimento. Assim, 1 ml da cultura foi diluído em 9 ml de meio de cultura. Utilizou-se 6 gotículas de 2 μ l dessa diluição, por repetição.

Para obtenção do peso fresco e peso seco, procedeu-se da mesma maneira que no experimento anterior.

Para obtenção do volume do conjunto de células, foram tomados 5 ml da suspensão e colocados em um tubo de centrífuga graduado. Centrifugou-se a 2000 g por 5 minutos. Anotou-se o volume de células concentradas no fundo do tubo (volume aproximado).

3.2.3. Regeneração de Plantas

Experimento 7

Das culturas de células do Experimento 5, foram retirados 3 ml de cada um dos 4 frascos (repetições) nos 6 tratamentos (0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias de cultivo), que foram inoculados em placas de Petri contendo 20 ml de meio M3.

Após as inoculações as placas foram mantidas na luz e após 3 semanas, quando já se verificava formação de

microcalos friáveis em grande quantidade (principalmente naquelas oriundas de cultivos de mais de 4 dias), realizou-se transferência desses calos para placas contendo meio M1.

Após 2 a 3 semanas realizou-se nova troca, agora para meio MR6.

Experimento 8

Este experimento possui 12 tratamentos e 4 repetições, sendo os tratamentos uma combinação de 3 diferentes meios de cultura e 4 diferentes formas de inoculação. Os meios de cultura testados foram o MR2, MR3 e MR7 e as formas de inoculação foram:

F1 - 10 ml da suspensão inoculados em 20 ml de meio líquido.

F2 - 1 ml da suspensão inoculados em placas com 20 ml de meio semi-sólido.

F3 - 10 ml da suspensão são filtrados à vácuo e o filtro é inoculado em placas com 20 ml de meio semi-sólido.

F4 - 10 ml da suspensão são filtrados e as células são recolhidas com auxílio de uma espátula e depositadas sobre o meio semi-sólido.

A suspensão utilizada como matriz era composta de células da var. SP 79-1011, de rico citoplasma, arredondadas e altamente homogêneas, contendo cerca de 4×10^6 células / ml, com 12 meses. Todas as inoculações foram feitas após troca do meio de manutenção pelo meio em questão, para

evitar interferências. O experimento foi mantido no escuro à temperatura de 27 ± 2 °C, sendo os tratamentos com meio líquido mantidos no agitador orbital, a 100 rpm.

Experimento 9

Objetivando verificar os efeitos da ausência de 2,4-D no meio de regeneração, 4 tratamentos foram testados, com 5 repetições, usando a mesma suspensão descrita acima.

Tratamento 1 - 10 ml de suspensão foram depositados em tubo de centrífuga, lavados 2 vezes em meio MR1, ressuspensos em 5 ml e inoculados em placas com o mesmo meio (1 ml / placa).

Tratamento 2 - Idem e inoculados em frascos com 20 ml de meio MR1, líquido (5 ml / frasco).

Tratamento 3 - Idem e inoculados em placas, já misturados em meio MR1 semi-sólido (40 °C).

Tratamento 4 - Idem e inoculados em forma de gotículas de 50 µl em placas com MR1 semi-sólido.

Experimento 10

Este novo experimento inclui pré-inoculação em meio rico em 2,4-D, para favorecer o crescimento de calos antes da regeneração. A suspensão utilizada é a mesma dos experimentos anteriores, com uma concentração de aproximadamente 3×10^6 células / ml. Foram inoculados 5 ml da suspensão em placas contendo M1. Após 15 dias foram

retirados discos de 0.8 cm de diâmetro e inoculados em meio de regeneração. Foram testados 3 meios de cultura: MR1, MR2 e MR3, sendo 5 discos por repetição e 3 repetições por tratamento.

Experimento 11

Visando testar os materiais quanto à capacidade de regeneração, células com vários subcultivos em suspensão (15 meses) e calos com 4.5 meses foram inoculados: Tratamento 1 - Calos das variedades SP 70-1143, com 4.5 meses.

Tratamento 2 - Calos da var. SP 79-1011, com 4.5 meses.

Tratamento 3 - Calos de suspensões da var. SP 79-1011, com 36 dias em MR1.

Tratamento 4 - Idem, em meio MR3.

Tratamento 5 - Idem, em meio MR2.

Tratamento 6 - Idem, em meio MR7.

Esse material (todos os tratamentos) foi inoculado em meio MR5, em tubos com 15 ml de meio, sendo 6 repetições por tratamento. Inoculou-se uma massa de calos em cada tubo. Incubação sob luz, à temperatura de 27 ± 2 °C.

Experimento 12

Este experimento consta da inoculação de calos provenientes de células em suspensão, var. SP 79-1011, de 15

meses de subcultivos, e de calos da var. SP 70-1143, com 5 meses. O meio utilizado foi o descrito por CHEN et alii (1988a), chamado de M36ac, que consiste em MS com 1 mg / l de 2,4-D, 500 mg/l de caseína hidrolisada, 5 % de água de coco e 1 g/l de carvão ativado, distribuído em tubos. A procedência do material era:

Tratamento 1 - Calos de SP 70-1143, com 5 meses.

Tratamento 2 - Células de SP 79-1011 em meio MR3.

Tratamento 3 - Células de SP 79-1011 em meio MR1.

Tratamento 4 - Células de SP 79-1011 em meio MR2.

Tratamento 5 - Células de SP 79-1011 em meio MR7.

Experimento 13

Duas suspensões celulares foram utilizadas neste experimento. Suspensão A: cultura de células da variedade SP 79-1011, datada de 1,5 anos com características bastante homogêneas. Suspensão B: cultura de células da variedade SP 70-1143, datada de 8 meses, apresentando agregados maiores de células e de características não tão homogêneas.

Os meios de cultura testados foram: MR1, MR3, MR5 e MR5 com 35, 40, 45, 50 e 60 g/l de sacarose (Tabela 2).

Para o meio MR1, cinco ml de cada suspensão foram inoculados e incubados à luz, sob agitação (40 rpm), sendo 3 placas por tratamento. Para o meio MR3, quatro ml de

cada suspensão foram depositados na superfície do meio solidificado e as placas foram mantidas na luz, sendo 3 frascos por tratamento. Para os meios MR5, 1 ml de cada suspensão foi inoculado em frascos contendo 15 ml de meio, sendo 3 frascos por tratamento.

Experimento 14

Células em suspensão da variedade SP 70-1143 com 3 meses de subcultivos foram inoculadas em meios semi-sólidos MR1, MR3 e MR5. Foram inoculados 5 ml por placa contendo 30 ml de meio, sendo 10 placas por tratamento. As placas foram mantidas na luz.

Após 20 dias, as estruturas verdes e arroxeadas foram transferidas para meio fresco MR1, onde ficaram por mais 20 dias, sendo então transferidas para tubos com o mesmo meio de cultura.

Experimento 15

A mesma suspensão celular utilizada no experimento anterior, agora com 5 meses, juntamente com outra suspensão da variedade SP 79-1011, com 5.5 meses de subcultivo foram utilizadas tentando regeneração nos mesmos meios do experimento anterior. Foram inoculados 5 ml de cada suspensão, totalizando 3 placas por tratamento. Mantido na luz.

As estruturas que surgiram tiveram o mesmo tratamento dado àquelas do experimento anterior.

3.3. ISOLAMENTO E CULTIVO DE PROTOPLASTOS

3.3.1. Utilizando Calos Embrionários

Experimento 16

Calos embrionários das duas variedades, obtidos de segmentos transversais de folhas jovens, foram subcultivados por 2 vezes em intervalos de 20 dias. Com o auxílio de uma lupa, foram selecionados e utilizados neste isolamento.

Foi utilizada a solução enzimática SE1, descrita na Tabela 3. Cerca de 3 g de calos foram colocados em placa de Petri juntamente com 12 ml da solução enzimática.

A incubação procedeu-se no escuro, sob agitação giratória de 40 rpm, por 6 horas. Após este período, a suspensão foi recolhida com pipeta de Pasteur e passada através de peneiras de nylon de 30 e 25 μm , sendo então recolhida em tubo de centrífuga cônico.

Após centrifugação a 700 rpm, por 4 minutos, o sobrenadante foi descartado e os protoplastos ressuspendidos em solução de CPW (27.2 mg/l de KH_2PO_4 , 101 mg/l de KNO_3 , 1480 mg/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 246 mg/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0.16 mg/l de KI e 0.025 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), descrita por FREARSON et alii (1973), com 13 % de manitol (p/v). Essa operação foi repetida 3 vezes. Como ainda haviam algumas impurezas, preparou-se um gradiente de sacarose/manitol: Em um tubo de centrífuga foram colocados 5 ml de uma solução CPW 21 % de sacarose (p/v) e adicionou-se cuidadosamente a suspensão de protoplastos concentrada em 3 ml de CPW 13 % de manitol (p/v). Centrifugou-se por 10 minutos à 700 rpm, com o freio da centrífuga desligado.

A suspensão com os protoplastos em CPW 13 % de manitol foi cuidadosamente recolhida e após acréscimo de certo volume de CPW 13 %, determinou-se o número de protoplastos isolados, com auxílio de câmara de Newbauer.

A viabilidade dos protoplastos foi obtida uma solução de azul de metileno na concentração de 0.01 %. Após 5 minutos contou-se os protoplastos viáveis e não viáveis (de coloração azul), em câmara de Newbauer.

O plaqueamento foi procedido em placas de Petri de 56 x 14 mm, descartáveis, utilizando o meio R2 (Tabela 4), sendo 4 placas para cada variedade. Inoculou-se 1.5 ml do preparado de meio com agarose (1,2 %) e meio sem agarose já com os protoplastos, na proporção de 1:1. Após solidificação, foram depositados 3 ml do mesmo meio de cultura líquido sobre a gota. As placas, seladas com Parafilm, foram incubadas no escuro à temperatura de 27 ± 2

°C e observadas diariamente em microscópio invertido.

Tabela 3. Soluções enzimáticas testadas no isolamento de protoplastos de cana-de-açúcar.

Componentes	Concentração (% p/v) e Designação das soluções			
	SE1	SE2	SE3	SE4
1) Celulases				
Celulase R10	-	-	2.0	-
Celulase RS	1.0	2.0	-	1.0
Driselase	-	0.1	0.5	-
2) Pectinases				
Macerozyme R10	-	0.2	-	0.2
Pectinase	-	0.2	-	-
Pectolyase Y23	0.2	-	0.1	0.1
3) Tamponante				
MES* (mM)	5.0	3.0	3.0	5.0
4) Estabilizadores osmóticos				
Manitol (M)	-	0.2	0.2	-
Sorbitol (M)	-	0.2	0.2	-
5) Outros				
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (mM)	-	0.7	0.7	-
CPW ** (13%)	C	S	S	C
pH	5.6	5.9	5.8	5.6

* MES = ácido 2 (N-morpholino) ethanosulfônico

** CPW (13%) = sais de CPW com 13% de manitol.

S = sem C = com

Tabela 4. Meios de cultura testados no cultivo de protoplastos de células em suspensão, descritos no Apêndice 1

Designação	Fonte
R2*	OHIRA et alii (1973)
KM8p	KAO & MICHAYLUK (1975)
N6*	CHU (1978)
GM*	CHEN (1986)

* Substituição da fonte de carbono por 0.4 M de maltose e 2.4-D ajustado para 2 mg/l. Agarose a 0.6%.

3.3.2. Utilizando Células em Suspensão

Experimento 17

Este experimento, o primeiro de uma série destinada ao isolamento de protoplastos a partir de suspensões celulares, teve como referência o trabalho de VASIL & VASIL (1980).

Cultura de células em suspensão, var. SP 79-1011, com 2 dias do último subcultivo, foi utilizada como fonte de células. A suspensão consistia de células e agregados pequenos de células embriogênicas, em uma concentração de aproximadamente 3.0×10^5 células / ml.

Os protoplastos foram obtidos através do

seguinte procedimento: 5 ml da suspensão celular foram colocados em um frasco de 250 ml e adicionou-se 25 ml da solução de enzimas SE3, descrita na Tabela 3. Essa suspensão foi levada ao agitador a 40 rpm, no escuro, por 2 horas, quando a porcentagem de protoplastos isolados já era relativamente alta. Os protoplastos passados através de peneira de nylon com malha de 45 μ m foram recolhidos e centrifugados a 700 rpm por 5 minutos. Após remoção do sobrenadante com pipeta de Pasteur, ressuspendeu-se os protoplastos em 10 ml de meio de cultivo KM8p (ver Apêndice 1).

Após 3 lavagens e ressuspensões neste mesmo meio, os protoplastos foram inoculados em placas de Petri, seladas e incubadas no escuro, à 27 ± 2 °C.

Experimento 18

Este experimento refere-se ao estudo de duas soluções enzimáticas no isolamento de protoplastos da variedade SP 79-1011.

A suspensão celular utilizada com dois dias do último subcultivo, tinha 12 meses na condição de suspensão e 3 meses na condição de calos.

As soluções enzimáticas testadas foram: SE2 e SE3, ambas descritas na Tabela 3.

Utilizou-se 5 ml de suspensão em 20 ml de

solução de enzimas.

Foram contados os protoplastos isolados a intervalos de 30 minutos. Para tanto, gotículas de 2 μ l foram depositadas sobre uma fina camada de meio de cultura, em placa de Petri. Os protoplastos foram contados em microscópio invertido. Foram contadas 6 gotículas por tempo de digestão. A suspensão utilizada como matriz tinha cerca de 1.03×10^6 células / ml. Para realização das contagens fez-se diluição na proporção de 1:10.

Experimento 19

Este experimento é um estudo de diferentes densidades de cultivo de protoplastos da variedade SP 79-1011, utilizando metodologia descrita por d'UTRA VAZ et alii (1993).

Foram utilizadas células em suspensão de 15 meses de subcultivos semanais, com trocas de meio a cada 2 dias durante os últimos 10 dias, para que a taxa de crescimento aumentasse, gerando células mais novas para o isolamento de protoplastos.

Tomou-se 10 ml da suspensão em uma pipeta comum graduada. Tampando-se a ponta da pipeta no fundo do frasco com a suspensão, decantou-se as células até obter volume desejado, ressuspensando e depositando em placa de Petri, até obter 3 ml de células compactadas. Colocou-se a

placa inclinada para nova decantação, que permitiu a retirada do meio sobrenadante com pipeta de Pasteur.

Realizou-se uma pré-incubação que consistiu em acrescentar aproximadamente 10 ml de uma solução de sais de CPW a 13 % de manitol, objetivando plasmolisar as células e assim evitar que as mesmas tivessem suas membranas danificadas no momento da digestão. Esse tratamento deu-se por 1 hora, quando então a solução foi retirada com pipeta de Pasteur após decantação.

Foi utilizada a solução enzimática SE4, descrita na Tabela 3. Para 3 ml de células compactadas foram utilizadas 12 ml da solução enzimática. A incubação foi de 16 horas, no escuro, à 40 rpm.

Após a incubação, a suspensão foi passada em peneira de 40 μ m e centrifugada em tubo de fundo cônico, à 700 rpm, por 4 minutos. A solução de enzimas foi descartada e os protoplastos ressuspensos em CPW 13 % de manitol, sendo novamente decantados por centrifugação. A operação foi repetida e o grau de pureza verificado em amostra levada ao microscópio invertido. Fez-se então o gradiente já descrito em experimento anterior. Procedeu-se assim a estimativa da produção de protoplastos isolados.

O meio de plaqueamento utilizado foi o KM8p, suplementado com 0.8 mg/l de 2,4-D.

Após nova centrifugação e descarte do CPW 13

% de manitol, preparou-se o meio de incubação misturando-se o meio KM8p em dupla concentração com igual volume de agarose a 1,2 %. Após a homogeneização com os protoplastos, fez-se a incubação nas seguintes densidades: 3.0, 5.0, 7.0 e 9.0 x 10⁵ protoplastos / ml.

O experimento constou de 4 repetições que foram divididas em duas formas de incubação: 2 com gotículas de aproximadamente 50 µl (totalizando 1 ml/placa) e 2 com camada de 2 ml no fundo da placa (56 x 14 mm).

Após solidificação do meio, acrescentou-se cerca de 2 ml de meio líquido em cada placa. Selou-se com Parafilm e incubou-se nas mesmas condições já descritas.

Experimento 20

Neste novo ensaio, buscou-se verificar a importância da escolha da suspensão celular no isolamento de protoplastos, da variedade SP 79-1011.

Foram utilizadas duas suspensões celulares: uma de 15 meses de idade e com 8 dias do último subcultivo, outra com 3 meses de idade e vinda de subcultivos em dias alternados durante 10 dias.

Seguindo-se procedimento idêntico ao descrito no experimento anterior, plaqueou-se em mesmo meio de cultura, sendo 5 repetições (placas), a uma densidade de cultivo de 4 x 10⁵ protoplastos / ml, na forma de gotículas

e 2 repetições na forma de camadas.

Fez-se redução do potencial osmótico da cultura após 3 dias de cultivo, através de remoção do meio líquido original e recolocação de KM8p e KM8 nas proporções de 2:1 e 1:1 após 5 dias, conforme recomendado por CHEN et alii (1988b).

Experimento 21

Trata-se de uma repetição do experimento anterior, com uma única modificação: o tempo de subcultivos da suspensão de 15 meses também se deu em dias alternados.

Plaqueamento: Suspensão de 3 meses - 4 placas com gotas na densidade de 4×10^5 protoplastos / ml e 2 placas com camadas na mesma densidade. Suspensão de 15 meses - 4 placas com gotas e 1 placa com camada na densidade de 2.0×10^5 protoplastos / ml; 4 placas com gotas e 1 placa com camada na densidade de 4.0×10^5 protoplastos / ml; 4 placas com gotas e 1 placa com camada na densidade de 6.0×10^5 protoplastos / ml.

Experimento 22

Teste de diferentes dias de subcultivo e diferentes meios de cultura para isolamento de protoplastos de uma suspensão celular da variedade SP 79-1011, com idade de 19 meses.

Isolou-se protoplastos de suspensões de 2, 4, 6 e 8 dias de subcultivos. A solução enzimática utilizada foi a SE1, descrita na Tabela 3 e normalmente utilizada para isolamento de protoplastos em arroz.

Utilizou-se 2 ml de células compactadas em 12 ml de solução enzimática. Não foi utilizado pré-incubação em CPW 13 %. O número de lavagens foi reduzido para 1. A incubação deu-se em agitação (40 rpm), no escuro e por 6.5 horas. Utilizou-se peneiras de nylon de 45 e 25 μm . A viabilidade dos protoplastos foi verificada como já descrito anteriormente. Testou-se a eficiência de plaqueamento em 4 diferentes tipos de meio de cultura: N6, R2, GM e KM8p (Tabela 4).

Os meios utilizados foram preparados em porções com agarose (1,2 %) e porções sem agarose, que eram então misturadas em iguais proporções, sendo a porção com agarose fundida a aproximadamente 40 °C.

A densidade de cultivo foi cerca de 3.0×10^5 protoplastos / ml. Todo o plaqueamento foi feito em camadas de aproximadamente 4 ml e cobertas com 2 ml de meio líquido.

Totalizou-se 16 placas, sendo 1 repetição por tratamento. A incubação foi a mesma descrita nos experimentos anteriores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CULTURA DE CALOS

4.1.1. Escolha do Meio de Cultura

Experimento 1

Os resultados referentes ao teste com diferentes meios de cultura para obtenção de calos estão apresentados na Tabela 5.

A separação em dois tipos de calos (Ver Figura 1a) está de acordo com o observado por GUIDERDONI & DEMARLY (1988), que relatam o desenvolvimento de calo friável, calo nodular, ou uma mistura de ambos.

VASIL & VASIL (1986) também separaram calos embriogênicos e não embriogênicos, embora em um trabalho anterior HO & VASIL (1983a) classificaram 3 tipos de calos: compacto, friável e mucilaginoso.

TAYLOR et alii (1992a) conseguiram separar 4 tipos de calos, sendo apenas dois tipos morfogênicos.

Tabela 5. Indução de calos nos explantes foliares de cana-de-açúcar, em % de explantes que formaram calos após 30 dias.

Meios de Cultura	SP 70-1143				SP 79-1011			
	F	E	FE	NF*	F	E	FE	NF
M0	12	-	09	79	16	-	-	84
M1	27	17	32	24	24	10	12	54
M2	21	20	44	15	16	30	39	15
M3	09	35	54	02	15	39	41	05
M4	26	27	34	13	20	32	39	09

* F = calos friáveis;
 E = calos embriogênicos;
 FE = calos friáveis e embriogênicos;
 NF = não formou calos.

Os meios de cultura contendo 3 mg/l de 2,4-D (M3 e M4) mostraram-se mais eficientes na produção de calos, principalmente embriogênicos. Este resultado está de acordo com o utilizado por NADAR et alii (1978), LARKIN (1982), AHLOOWALIA & MARETZKI (1983), HO & VASIL (1983a e 1983b), LIU (1984) e CHEN et alii (1988a) que descrevem o meio M3 utilizado neste trabalho.

4.1.2. Regeneração de Plantas a Partir de Calos

Experimento 2

Como pode ser observado na Tabela 6, não houve diferenças significativas entre os três meios de cultura utilizados para regeneração de plantas. A relativa facilidade de se obter diferenciação dos calos do tipo I deve-se provavelmente à sua competência embriogênica.

Tabela 6. Regeneração de plantas a partir de calos de cana-de-açúcar, em % de calos que regeneraram plantas*.

Meios de Cultura	SP 70-1143		SP 79-1011	
	Tipo I	Tipo II**	Tipo I	Tipo II
MR0	85a	2	79a	2
MR1	87a	8	82a	-
MR4	78a	-	58b	-
CV (%)	14		16	

* Observações a partir de 25 explantes em cada tratamento.

** Tipo I = calos nodulares; Tipo II = calos friáveis.

Números seguidos de letras iguais não diferem entre si (na vertical) pelo teste de Tukey, a 5%.

Quanto aos calos do tipo II, nota-se a incapacidade de regeneração de plantas em quase todos os

Figuras 1a. Formação de calos nodulares (Tipo I) e friáveis (Tipo II) a partir de explantes foliares de cana-de-açúcar, var. SP 70-1143

1b. Regeneração de gemas a partir de calos da variedade SP 70-1143.

4.2. CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

4.2.1. Obtenção e Manutenção

Experimento 3

A seleção prévia dos calos utilizados para iniciar suspensões celulares mostrou-se benéfica como mostra os resultados expressos nas Tabelas 7 e 8, embora não seja uma operação indispensável.

Tabela 7. Qualidade das suspensões celulares de cana-de-açúcar, var. SP 79-1011, em diferentes meios de cultura. Os nº representam os frascos observados.

Meios de Cultura	Tipo I				Tipo II*			
	E	A	EA	O**	E	A	EA	O
M0	-	1	-	1	-	1	-	1
M1	-	-	1	1	-	1	-	-
M2	1	-	1	-	-	1	-	1
M3	2	-	-	-	-	-	2	-
M4	-	1	1	-	-	-	1	1

* Tipos de calos utilizados para iniciar suspensões:
I = calos nodulares; II = calos friáveis.

** E = células embriogênicas; A = células alongadas;
EA = células embriogênicas e alongadas;
O = células oxidadas.

Observações a partir de 2 frascos por tratamento.

Tabela 8. Qualidade das suspensões celulares de cana-de-açúcar, var. SP 70-1143, em diferentes meios de cultivo. Os nº representam os frascos observados.

Meios de Cultura	Tipo I				Tipo II*			
	E	A	EA	O*	E	A	EA	O
M0	-	-	-	2	-	-	-	2
M1	-	1	-	1	-	2	-	-
M2	-	-	2	-	-	-	2	-
M3	1	-	1	-	-	-	2	-
M4	-	-	1	1	-	1	1	-

* Tipos de calos utilizados para iniciar suspensões:

I = calos nodulares; II = calos friáveis.

** E = células embriogênicas; A = células alongadas;

EA = células embriogênicas e alongadas;

O = células oxidadas.

Observações a partir de dois frascos por tratamento.

Embora alguns autores recomendem o uso do calos friáveis para suspensões celulares, pela facilidade de desagregação no meio, líquido (PONCE, 1984; LIU, 1984), o uso de calos embriogênicos acelera o processo de homogeneização da cultura, que se torna rica em células arredondadas, uniformes e com denso citoplasma (VASIL & VASIL, 1986).

Os meios de cultura M2 e M3 mostraram melhores resultados, embora este experimento sirva apenas para dar uma

idéia do comportamento das suspensões. A grande maioria dos trabalhos com células em suspensão preconiza composições semelhantes de meios de cultura, mais especificamente quanto aos componentes 2,4-D, caseína hidrolisada e água de coco (HO & VASIL, 1983a e 1983b; PONCE, 1984).

Com base nessas observações, o meio de cultura escolhido para dar continuidade aos trabalhos foi o M3 para iniciar a suspensão (cerca de dois meses), e para manutenção optou-se por reduzir a dosagem de 2,4-D para 1.5 mg / ml, visando diminuir a taxa de multiplicação das células.

4.2.2. Quantificação do Crescimento

Experimento 4

A Tabela 9 mostra os resultados das contagens diárias das células em suspensão utilizadas na tentativa de construção de sua curva de crescimento.

A Tabela 10 mostra a proporção das células embriogênicas e células indesejáveis (oxidadas, alongadas e vacuoladas) no início e no final do período.

A Figura 2 apresenta os valores da Tabela 9 em as curvas de crescimento de cada tratamento.

A Figura 3 mostra as proporções da Tabela 10 em forma de barras.

Tabela 9. Crescimento da cultura de células em suspensão de cana-de-açúcar, var. SP 70-1143, em nº de células ($\times 10^5$ / ml)*.

Dias de Cultivo	Sem troca de meio	Com troca de meio	Testemunha **
1º dia	0.276	0.225	0.310
2º dia	0.826	0.726	-
3º dia	1.193	1.186	-
4º dia	1.362	1.503	-
5º dia	1.484	1.676	-
6º dia	1.422	1.505	-
7º dia	1.280	1.372	-
8º dia	0.907	1.106	-
9º dia	0.703	0.938	1.910

* Cada número representa um média de 3 frascos.

** Testemunha: frasco sem nenhuma manipulação nos nove dias.

Figura 2. Crescimento da cultura de células em suspensão de cana-de-açúcar, var. SP 70-1143

Tabela 10. Proporção entre células embriogênicas e células indesejáveis em cultura de células em suspensão de cana-de-açúcar, var.SP 70-1143, no 1º e no 9º dia de subcultivo.

Período	sem troca de meio		com troca de meio		testemunha	
	E	I*	E	I	E	I
1º dia	0.23	0.04 (14.80%)	0.20	0.03 (13.04%)	0.54	0.04 (6.90%)
9º dia	0.39	0.30 (43.48%)	0.57	0.37 (39.36%)	1.73	0.17 (8.95%)

* E = células embriogênicas; I = células indesejáveis.

Figura 3. Proporção de celulas embriogênicas e indesejáveis
var. SP 70-1143 (1º e 9º dias)

Analisando os resultados, é possível verificar um nítido crescimento do número de células até o quinto dia de contagem, quando se inicia um pronunciado declínio nos dois tratamentos (com troca e sem troca de meio de cultura). Já a testemunha, que teve apenas duas contagens, uma no início e outra no final, mostra um número de células muito maior que os dois tratamentos, exibindo ainda melhor qualidade de células (ver na Tabela 10 a baixa porcentagem de células indesejáveis no final do período).

Isso faz concluir que o excesso de manipulação das culturas pode ter provocado a morte de células e oxidação, causando drástica redução na sua população.

A metodologia de contagem utilizada neste experimento foi uma adaptação daquelas encontradas na literatura, numa tentativa de facilitar a tarefa e dispensar o uso de desagregantes. No próximo experimento, uma análise estatística dirá se este método é seguro ou não.

Experimento 5

A Tabela 11 mostra os resultados das contagens de células, peso fresco e peso seco / ml da suspensão celular da var. SP 79-1011.

A análise estatística partiu de delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos (dias de cultivo), 4 repetições e 5 determinações por repetição.

Tabela 11. Crescimento da cultura de células em suspensão de cana-de-açúcar, var. SP 79-1011, em número de células ($\times 10^5$ / ml), peso fresco e peso seco (mg / ml).

Dias de avaliação	Peso fresco mg/ml	Peso seco mg/ml	Nº de células ($\times 10^5$ /ml)
0	5.793 f	0.137 f	0.437 f
2	9.350 e	0.345 e	0.763 e
4	15.529 d	0.754 d	1.329 d
6	22.894 c	1.664 c	2.820 c
8	29.855 ab	2.601 b	5.422 b
10	39.690 a	4.211 a	9.013 a
CV (%)	5.012	7.714	14.547

Números seguidos de letras iguais não diferem entre si (na vertical) ao nível de 5% (teste de Tukey).

Observando-se a variação no número de células que ocorreu entre as avaliações de cada repetição, pode-se determinar a viabilidade do método de amostragem empregado, uma vez que, sendo esta variação muito elevada haveria indícios de que o procedimento utilizado é inadequado. Assim, a análise de variância para o parâmetro nº de células inclui a variação "dentro de parcelas".

Para análise estatística dos parâmetros peso fresco e peso seco, o modelo estatístico é: $Y_{ij} = m + t_i + e_{ij}$,

sendo m = média, t_i = efeito dos diferentes dias de cultivo e e_{ij} = erro experimental.

Foi aplicado o teste do F máximo de Pearson & Hartley para verificar a homogeneidade de variância. Como os dados sugeriram distribuição Gama, a transformação indicada foi $\log(x+1)$ para peso seco (já que os dados apresentavam valores menores do que 1) e $\log(x)$ para peso fresco.

Uma vez realizada a transformação, foi aplicado o teste F máximo novamente, constatando assim a homogeneidade das variâncias.

As análises de variância para peso fresco e peso seco e nº de células estão representados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados das análises de variância para peso fresco, peso seco e nº de células da var. SP 79-1011, em 10 dias de cultivo.

Variáveis	F	CV(%)
Peso fresco	107.75**	5.012
Peso seco	349.57**	7.714
Nº de Células	368.52**	14.547

** Teste F significativo ao nível de 1 %.

Os contrastes de média apresentado mostram que todos os tratamentos diferem entre si ao nível de 5 % (exceto 8 e 10 dias, para o parâmetro peso fresco). O coeficiente de variação foi baixo, estando adequado ao modelo proposto. Com base nos dados apresentados nas análises de variância pode-se concluir que há diferenças significativas (ao nível de 1 %) entre os tratamentos, ou seja, há um crescimento significativo da cultura de células no decorrer do período.

Para a avaliação considerando nº de células / ml, o modelo estatístico é: $Y_{ijk} = m + t_i + e_{ij} + d_{ijk}$, sendo m = média, t_i = efeito dos diferentes dias de cultivo, e_{ij} = erro experimental, efeito das repetições dentro de um mesmo tratamento e d_{ijk} = diferenças entre as repetições de uma mesma parcela.

Para a análise de variância deste parâmetro, valem as mesmas observações feitas para os dois parâmetros anteriores.

Analizando a Figura 4, verifica-se que o número de dias de avaliação foi insuficiente para localizar o pico de crescimento e posterior declínio, mas pode-se verificar o intenso crescimento da cultura neste período. Assim, uma cultura que apresente cerca de 0.45×10^5 células / ml após troca de meio de cultura, pode ser mantida por cerca de 10 dias sem troca de meio, quando então terá seu número de células multiplicado por aproximadamente 20.

Figura 4. Crescimento da cultura de células em suspensão, var. SP 79-1011.

Em se tratando de peso de células, embora tanto peso fresco quanto peso seco tenham se apresentado adequados na quantificação do crescimento, é mais recomendável a avaliação por peso seco, uma vez que o tempo de filtragem à vácuo é variável, podendo ocasionar diferenças no teor de umidade da massa de células para determinar o peso fresco.

Experimento 6

A Tabela 13 mostra os resultados das contagens de células, peso fresco, peso seco e volume da massa celular da suspensão da var. SP 79-1011, para este experimento.

A análise estatística partiu de delineamento inteiramente casualizado, com 17 tratamentos (tempos de cultivo), 3 repetições e 6 determinações por repetição para o parâmetro número de células.

A Tabela 14 mostra os resultados das análises de variância, que tiveram observações semelhantes às aquelas apresentadas no experimento anterior. A Tabela 15 traz as equações das curvas de crescimento para os parâmetros avaliados.

Analisando a Figura 5 pode-se verificar que o número de dias de avaliação permitiu a localização do pico de crescimento e posterior declínio da cultura.

Tabela 13. Crescimento da cultura de células em suspensão da var. SP 79-1011, em número de células ($\times 10^5$ / ml), peso fresco e peso seco (mg / ml) e volume do conjunto de células (% v/v).

Dias de avaliação	Peso fresco mg/ml	Peso seco mg/ml	Volume (%)	Nº de células ($\times 10^5$ /ml)
0	62.98	4.34	3.066	3.387
2	63.42	5.02	3.600	4.955
4	71.04	5.94	6.000	5.827
6	83.66	8.26	7.800	7.667
8	83.48	9.18	7.93	10.511
10	93.50	9.88	8.733	11.925
12	107.96	10.66	9.933	13.272
14	114.60	10.80	10.600	13.247
16	123.76	12.30	10.730	11.436
18	142.34	13.44	13.000	10.460
22	150.12	15.84	14.060	8.044
26	159.46	16.04	17.666	6.915
30	169.48	17.50	17.666	6.643
34	171.60	16.56	18.000	5.939
38	157.56	15.60	17.666	4.982
42	156.30	14.50	17.000	4.803
46	149.00	12.32	17.666	3.890
CV (%)	12.95	7.04	5.82	24.85

Cada número representa uma média de 3 frascos.

**Figura 5. Crescimento da suspensão celular de cana-de-açúcar
var. SP 79-1011**

Tabela 14. Resultados das análise de variância para peso fresco, peso seco, volume e número de células em suspensão da var. SP 79-1011, em 46 dias de cultivo.

Variáveis	F	CV (%)
Peso fresco	18.9416**	12.949
Peso seco	79.2583**	7.040
Volume	171.4914**	5.817
Nº de células (determinações)	49.8017** 0.9378 ^{ns}	24.850

Teste F significativo ao nível de 1 %.

Tabela 15. Equações das curvas de crescimento de células em suspensão da var. SP 79-1011, para diferentes variáveis.

Variável	Equação	R ²
Peso fresco	$Y = 75.250 + 2.381 X$	0.7913**
Peso seco	$Y = 7.2145 + 0.230 X$	0.6454**
Volume	$Y = 5.3237 + 0.337 X$	0.8797**
Nº de células		0.1136 ^{ns}

** Significativo ao nível de 1 %.

Com relação aos parâmetros avaliados, nota-se um comportamento similar das curvas de pesos e volume do

conjunto de células. Todas apresentaram pico por volta do 30º dia. Se apenas tais parâmetros fossem utilizados para a escolha do momento ideal de troca de meio de cultura durante a manutenção, certamente estar-se-ia cometendo um erro, uma vez que eles não fornecem informações sobre a qualidade das células.

Analizando a curva de crescimento com base no número de células, tem-se uma idéia geral do tipo de células presentes, já que são contadas apenas as embriogênicas, com potencial de multiplicação.

A partir de determinado ponto, a capacidade de multiplicação das células diminui, aumentando o número de células mortas, alongadas e vacuoladas. A presença de células vacuoladas faz com que o volume celular aumente, sem contudo, haver multiplicação da célula. Isso justifica o fato de parâmetros como peso e volume total continuarem em ascensão enquanto o número de células embriogênicas entra em declínio.

O pico de crescimento, em número de células embriogênicas, ocorre entre o 12º e o 14º dia, embora a partir do 10º dia já se observe algumas células em processo de vacuolarização. Supõe-se assim, que a troca de meio de cultura realizada no pico de crescimento, diluindo quando a concentração estiver elevada (por volta de $5-10 \times 10^5$ células / ml), promoverá uma multiplicação mais intensa na próxima fase, dada as ótimas condições das células inoculadas. Se a

cultura ficar sem subcultivo por mais de 15 dias, haverá um crescente declínio na qualidade das células e a recuperação de uma cultura com alta porcentagem de células embriogênicas tornar-se-a cada vez mais difícil.

Confrontando os resultados obtidos nesta série de experimentos que quantificam a multiplicação das células, com aqueles encontrados na literatura, pode-se inferir algumas observações.

Quanto ao pico de crescimento, HO & VASIL (1983b) observaram o máximo número de células no 8º dia. Neste trabalho, o pico deste parâmetro ocorreu por volta do 13º dia, embora já se observassem células em processo de vacuolarização e/ou oxidação. LARKIN (1982) chegou a um resultado semelhante (aproximadamente 15º dia), mas utilizando um parâmetro mais complexo, a colorimetria.

HO & VASIL (1983b) observaram que após o 6º dia, algumas células tornavam-se alongadas e vacuoladas contribuindo para aumentar os parâmetros de peso fresco e volume da massa celular. Isto está de acordo com as suposições que foram descritas neste trabalho para explicar o porquê destes parâmetros continuarem aumentando quando o número de células já entrava em declínio.

Cabe descrever aqui, que em algumas culturas, que não aquelas utilizadas nestes experimentos, houve produção de uma substância mucilagínosa, que tornava o meio

- Figura 6. Estruturas diferenciadas presentes em algumas culturas em suspensão, resultantes do fenômeno de rizogênese.
- 6a. Rizogênese em suspensões celulares heterogêneas, com presença de células tubulares.
  - 6b. Detalhe da estrutura radicular mostrando eixo central e extremidade semelhante à coifa.
  - 6c. Corte histológico transversal mostrando alternância entre xilema e floema e presença de estrias de Caspary na endoderme, comuns em tecidos radiculares. (ver seta)

4.2.3. Regeneração de Plantas

Experimento 7

Após um mês das transferências dos calos formados de suspensões celulares para placas contendo MR6, todo o material foi descartado por oxidação generalizada em todas as placas.

A única informação que foi extraída deste experimento é a de que as inoculações de suspensões mais concentradas (com 6, 8 e 10 dias de cultivo) apresentaram maior formação de calos do que a de menor concentração (0, 2 e 4 dias), embora todas gerassem calos bastante friáveis e sem competência morfogênica.

A explicação para este insucesso pode ser dado pela perda de capacidade de diferenciação das células, bastante improvável pelo pouco tempo de subcultivos (3 meses) ou pela inadequação do meio de cultura empregado.

Experimento 8

Houve início de formação de calos somente em tratamentos que receberam os meios de cultura MR3 e MR7, ambos com 1 mg/l de 2,4-D. Os tratamentos com o meio MR2, que não possui 2,4-D, mostraram início de oxidação. Para as inoculação em meio líquido (Tratamentos 1, 5 e 9) não foram verificadas alterações. O tratamento 3 foi perdido por

contaminação.

Para a segunda avaliação, realizada com 20 dias, a diferença marcante em relação à primeira é o aumento da oxidação e o início dela em tratamentos com meio líquido. Na terceira avaliação o que se observa é uma oxidação intensa de todo o material, inclusive nos calos formados até o 20º dia, com estagnação do crescimento. Esse material foi mantido por mais 10 dias para certificar-se do não desenvolvimento de nenhuma estrutura embriogênica. Como resultado final, observou-se que em nenhum dos tratamentos houve sobrevivência.

Esse quadro leva a três suposições: os meios de cultura não foram adequados; deveriam ter sido realizadas transferências após o 20º dia; as células das suspensões utilizadas como matriz não eram viáveis.

Se para formação de embrióides é necessário passagem pela fase de calos, parece claro que o meio utilizado deve conter uma quantidade razoável de auxina, um regulador limitante para cana-de-açúcar, mas que deve ser diminuído para que haja embriogênese.

Experimento 9

A primeira avaliação deste experimento (descrito no item 3.2.3.) foi realizada 8 dias após as inoculação e mostrou os seguintes resultados:

Tratamento 1 - O meio líquido foi totalmente consumido, mostrando uma massa de células de intenso crescimento, homogênea e sem protuberâncias.

Tratamento 2 - Intenso crescimento celular, células pequenas, com rico citoplasma e arredondadas. Foram acrescentados 10 ml de meio fresco.

Tratamento 3 - As células apresentaram-se com o mesmo aspecto do inóculo inicial, sendo possível notar que houve multiplicação do número de células.

Tratamento 4 - As gotículas de 40 μ l também apresentaram densa massa de células.

Após 15 dias foi feita nova avaliação, que mostrou início de oxidação das células de todas as parcelas, comprovando os resultados do experimento anterior. Isso conduziu ao seguinte raciocínio: se as células não se desenvolvem em meio de regeneração contendo citocininas, mas também não progridem em meios com alta concentração de 2,4-D (1 mg/l), estacionando na proliferação de calos, parece lógico que o próximo passo deva ser a inoculação das células em meio contendo 2,4-D para uma prévia formação de calos, e em seguida, transferência para meio de regeneração com baixa ou nenhuma quantidade do regulador.

Experimento 10

Após 15 dias foi realizada a primeira avaliação deste experimento (descrito no item 3.2.3.).

Tratamento 1 - Não houve desenvolvimento após a transferência em nenhuma repetição.

Tratamento 2 - Intenso crescimento de calos, sendo uma repetição com início de oxidação.

Tratamento 3 - Não houve desenvolvimento após transferência em nenhuma das repetições.

Após 10 dias, os resultados mantinham-se sem nenhuma alteração, exceto pelo aumento da oxidação em uma das parcelas do tratamento 2 e oxidação total dos tratamentos 1 e 3.

Pensando na possibilidade de estimular a regeneração com luz, tomou-se uma das placas do Tratamento 2, com intensa formação de calos e distribuiu-se em placas com os seguintes meios de cultura e condições:

- 1 - Meio MR3, sob luz;
- 2 - Meio MR3, no escuro;
- 3 - Meio MR2, sob luz;
- 4 - Meio MR2, no escuro;
- 5 - Meio MR1, sob luz;
- 6 - Meio MR1, no escuro;
- 7 - Meio MR7, sob luz;
- 8 - Meio MR7, no escuro.

Após 12 dias avaliou-se esse novo ensaio e obteve-se o seguinte resultado:

- 1 - Intensa proliferação de calos, mas com alguns pontos de oxidação.
- 2 - Idem.
- 3 - Sem proliferação de calos, com início de oxidação.
- 4 - Idem, com muita oxidação.
- 5 - Intensa proliferação de calos, com alguns pontos de oxidação.
- 6 - Sem proliferação de calos, com início de oxidação.
- 7 - Intensa proliferação de calos, com alguns pontos de oxidação.
- 8 - Idem.

Após o 8º dia, também não surgiram novidades, mas o material foi mantido e os tratamentos 2, 4, 6 e 8 foram utilizados no próximo experimento.

Por mais este insucesso, a hipótese de perda de capacidade de regeneração das células por excesso de subcultivos foi reforçada. Para descartar a possibilidade dos calos mantidos em subcultivos já apresentarem incapacidade de regeneração, iniciou-se mais um experimento (descrito no item 3.2.3.), desta vez envolvendo calos obtidos de repicagens e calos provenientes de suspensões celulares (tratamentos 2, 4, 6 e 8 deste experimento).

Experimento 11

Como já foi esclarecido no parágrafo anterior, este experimento visou testar os materiais que estavam sendo utilizados neste trabalho, células com vários subcultivos em suspensão (15 meses) e calos com 4.5 meses de subcultivo.

A avaliação realizada após 25 dias, mostrou os seguintes resultados:

Tratamento 1 - Presença de pequenas touceiras de plantas de verde intenso e estruturas semelhantes a pequénas raízes, translúcidas.

Tratamento 2 - Presença de plantas, mas em menor quantidade que o tratamento anterior.

Tratamento 3, 4 e 5 - Sem qualquer indício de desenvolvimento, com início de oxidação.

Como pode ser visto, é nítida a capacidade de regeneração dos calos que não passaram pela fase de suspensão, pois só se observa início de regeneração naqueles tratamentos que receberam os calos das duas variedades com 4.5 meses de subcultivo. Comparando-se as duas variedades, pode-se observar um melhor desempenho na variedade SP 70-1143, que apresentou até então, cerca de 15 touceiras de plantas e cerca de 80 estruturas translúcidas, semelhantes a raízes, enquanto que a variedade SP 79-1011 apresentou cerca de 8 touceiras e 18 estruturas translúcidas.

Nos demais tratamentos, não há evidências de

regeneração, sendo que apenas o tratamento 5 continua sem oxidação. Assim sendo, o questionamento da viabilidade das células em suspensão torna-se mais forte.

Experimento 12

Após uma semana de incubação, em fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 27 °C, o tratamento 1 (proveniente de calos) já apresentava brotos em todas as repetições, enquanto os demais (provenientes de suspensões) não tinham nenhum indício de regeneração, comprovando mais uma vez a hipótese lançada.

Experimento 13

Este experimento corresponde ao primeiro, desta série de tentativas de regeneração, que mostrou sinais de diferenciação.

Descrevendo as observações realizadas após 15 dias de instalação do experimento, pode-se dizer que para o meio MR2, as 3 placas inoculadas com suspensão B (SP 70-1143 com 8 meses) apresentavam desenvolvimento de calos com pigmento arroxeadado e com características embriogênicas (nodulares). Para o meio líquido MR1, os 3 frascos inoculados com a suspensão B apresentaram estruturas verdes e arroxeadas, semelhantes àsquelas observadas no meio MR2. Já a suspensão A, em meio MR2, apresentou estruturas radiculares

semelhantes àquelas já descritas neste trabalho. O mesmo ocorreu com esta mesma suspensão inoculada nos meios MR5 que sofreram variações na concentração de sacarose. Para a solução B houve oxidação de todos os frascos contendo MR5 e derivados.

Todas as tentativas de regeneração dessas estruturas após individualização foram infrutíferas, mas a presença de diferenciação, embora incompleta, permitiu supor que tal busca não é infundada.

Experimento 14

Semelhante ao que ocorreu no experimento anterior, surgiram estruturas verdes e arroxeadas em calos nodulares derivados da suspensão de SP 70-1143 com 3 meses de subcultivo, após 20 dias da inoculação.

Os resultados estão resumidos na Tabela 16.

Tabela 16. Efeito de diferentes meios de cultura na regeneração de plantas das variedades SP 79-1011 e SP 70-1143.

Meios de cultura	nº de estruturas por placa*		nº de plantas indiv. por placa*	
	SP70-1143	SP79-1011	SP70-1143	SP79-1011
MR1	5	4	8	7
MR3	3	4	7	1
MR5	6	3	8	4

* Os números correspondem a médias de 10 placas.

Embora o número de observações tenha sido pequeno é possível concluir que a capacidade de regeneração das células foi independente do meio de cultura empregado, uma vez que houve regeneração em todos os tratamentos. (Ver Figura 7).

Houve perda de cerca de 50% das platinhas individualizadas em tubos de ensaio, por estagnação no desenvolvimento e posterior oxidação. É provável que esta individualização tenha sido feita precocemente (com 20 dias), danificando o material.

Experimento 15

Este experimento correspondeu a uma repetição do experimento anterior, envolvendo agora ambas as variedades.

Os resultados obtidos confirmaram aqueles já apresentados e atestam a capacidade de regeneração também da var SP 79-1011 (Tabela 16).

4.2.4. Discussão

Na Revisão de Literatura, foi tratado da obtenção e manutenção de culturas de células em suspensão e sua capacidade de regeneração em plantas. Na ocasião relatou-se as dificuldades de sucesso nesta última tarefa.

A perda da capacidade morfogênica das culturas mantidas por longo período na condição de suspensão, parece ser um grande problema a ser enfrentado por pesquisadores comprometidos com a manipulação genética visando o melhoramento da cultura .

Com base nos resultados obtidos na série de tentativas de regeneração de plantas a partir de células, não é possível inferir conclusões a cerca de perda da capacidade de regeneração, pois não se sabe se esta capacidade chegou a existir. Foram utilizadas culturas com diversos tempos de subcultivos desde 3 meses até 1,5 anos e houve insucesso

também nas mais jovens.

Um dado que despertou interesse foi a característica das suspensões celulares que regeneraram plantas: Ambas apresentavam-se um pouco heterogêneas, com presença de algumas células de formato irregular, tubulares (Ver Figuras 7a e 7b). Esse tipo de célula também estava presente nas culturas onde surgiram estruturas rizogênicas. Este dado é condizente com o apresentado por TAYLOR et alii (1992a) que regeneraram plantas de agregados de células em culturas heterogêneas de 5 meses, mas não foram capazes de regenerar plantas de culturas homogêneas.

De um modo geral as regenerações completas, incluindo raízes, levaram cerca de 2 meses, desde a inoculação das suspensões em meio semi-sólido até a transferência para terra com vermiculita. Considerando os resultados mostrados por outros autores, este tempo é relativamente curto e talvez a transferência para casa de vegetação tenha sido precipitada, o que provocou perda de cerca de 50% das plantas transferidas.

GNANAPRAGASAM & VASIL (1990) relataram a necessidade de 4 meses para a produção de plantas oriundas de células criopreservadas. HO & VASIL (1983b) não descreveram o tempo gasto com o processo de regeneração.

AHLOOWALIA & MARETZKI (1982) não obtiveram sucesso na diferenciação de suspensões celulares inoculadas

- Figura 7. Regeneração a partir de células em suspensão, var. SP 70-1143.
- 7a. Cultura heterogênea mostrando a presença de células tubulares, var. SP 70-1143.
  - 7b. Cultura homogênea mostrando células arredondadas, em intenso processo de divisão (ver formação de lamela média nas setas).
  - 7c. Possível pró-embrião formados de calos oriundos de suspensões celulares.
  - 7d. Pró-embrião em estágio mais avançado de diferenciação.
  - 7e. Planta diferenciada, com parte aérea bem formada.
  - 7f. Multiplicação das plantas, em fase de enraizamento.

4.3. ISOLAMENTO E CULTIVO DE PROTOPLASTOS

4.3.1. A partir de Calos Embriogênicos

Experimento 16

Este isolamento mostrou um rendimento relativamente elevado, em termos de protoplastos liberados após tratamento enzimático. A variedade SP 79-1011 liberou 2.5×10^6 protoplastos em 12 ml de solução enzimática e a variedade SP 70-1143 liberou 3.3×10^6 protoplastos na mesma solução de enzimas.

O teste de viabilidade forneceu os seguintes resultados: SP 79-1011 - 96% de protoplastos viáveis; SP 70-1143 - 98% de protoplastos viáveis.

Após 2 dias de cultivo, observou-se um certo aumento de volume em alguns protoplastos, mas de forma geral, muitos foram rompidos, sem ressíntese de membrana, indicando uma possível inadequação do meio de cultivo utilizado. Não houve, portanto, ressíntese de parede celular. A partir de então, não foi observada nenhuma evolução neste experimento.

4.3.2. A partir de Células em Suspensão

Experimento 17

Apesar dos resultados iniciais indicarem uma

grande quantidade de protoplastos isolados, após 2 dias de cultivo o que se observou foi uma plasmolização geral dos protoplastos. Houve também aderência das membranas, uma vez que a inoculação foi feita em meio líquido. Não houve formação de colônias.

Experimento 18

A Figura 8 ilustra graficamente os padrões de isolamento das duas soluções enzimáticas." Observa-se diferentes picos de isolamento para as duas soluções. A solução SE2 apresentou o maior número de protoplastos isolados após 3.5 horas de digestão, enquanto a solução SE3 teve seu pico após 2.5 horas, contrariando as recomendações encontradas na literatura de 5 horas de maceração para a mesma solução enzimática. Houve um surpreendente declínio no número de protoplastos isolados após o pico, nas duas soluções utilizadas, levando a crer que a idade das células possa ter contribuído para isso, ou seja, o estado fisiológico das mesmas favoreceu um ataque excessivo da parede, afetando também a membrana plasmática. Convém ressaltar, que tratam de suposições, já que o processo de degradação da parede celular sofre interferência de vários outros fatores, além do estado fisiológico das células, podendo ser citado a pressão osmótica, a composição da solução enzimática, etc. (EVANS & COCKING, 1977).

Fig.8. Padrão de isolamento de protoplastos, var. SP 79-1011 nas soluções enzimáticas, SE2 e SE3, descritas na Tabela 3.

Experimento 19

Este experimento não pôde ser avaliado, pois metade foi perdido por contaminação e a outra metade apresentou alguma regeneração irregular de parede, não chegando à divisão.

Experimento 20

Comparando os isolamentos de protoplastos das duas suspensões celulares, observou-se que apenas a suspensão celular com 2 dias de subcultivo (3 meses de idade) liberou protoplastos, com um rendimento de 4.0×10^6 protoplastos em 12 ml de solução enzimática, para 3 ml de células compactadas; o mesmo não ocorrendo com a suspensão de 8 dias (15 meses de idade).

Neste experimento, possivelmente não houve regeneração de paredes, já que não foram observados avanços posteriores.

Experimento 21

Nesta repetição do experimento anterior, o uso de suspensões de 2 dias (tanto a de 3 como a de 15 meses) foi positivo para o isolamento de protoplastos. A suspensão de 3 meses apresentou um rendimento de 3.0×10^6 protoplastos e a de 15 meses, liberou 3.0×10^7 protoplastos.

Este resultado demonstrou a importância de se

ter células novas no tratamento enzimático. O meio de cultura utilizado para plaqueamento mostrou-se mais uma vez inadequado, não permitindo o processo de divisão dos protoplastos.

Experimento 22

Neste experimento, a mudança dos meios de cultivo foi decisiva para o desenvolvimento de calos dos protoplastos.

A Tabela 17 mostra os resultados obtidos após o tratamento enzimático, em termos de rendimento e viabilidade (medido pelo método de coloração com azul de Evans).

Tabela 17. Isolamento de protoplastos de células em suspensão da var. SP 79-1011, com 19 meses de subcultivo.

Tempo de subcultivo	Rendimento (nº de protopl.x 10 ⁶)	Viabilidade (%)
2	15.6	97.0
4	21.3	96.3
6	13.8	94.5
8	10.5	88.4

A Figura 9 retrata os passos descritos neste experimento.

No primeiro dia após o plaqueamento, os protoplastos das suspensões de 2 e 4 dias apresentavam intensa atividade citoplasmática, já aqueles das suspensões de 6 e 8 dias não apresentavam diferenças. Para quantificar o posterior aumento de volume dos mesmos, foram contados aqueles que apresentavam esse processo após 4 dias. Os resultados estão na Tabela 18.

Tabela 18. Aumento de volume observado em protoplastos isolados de células em suspensão, após 4 dias de cultivo, em porcentagem do total de protoplastos contados em determinado campo.

Tempo de subcultivo	Meios de cultivo			
	KM8p	N6	R2	GM
2	-	22.9	25.6	12.6
4	-	3.5	11.6	9.4
6	-	23.5	18.5	8.3
8	-	20.0	15.0	24.6

É clara a ausência de desenvolvimento das culturas inoculadas em meio KM8p, confirmando as suspeitas mencionadas anteriormente. Embora não haja grandes diferenças entre os

dias de cultivo, parece claro que os meios N6, R2 e GM surtiram um efeito no processo de regeneração de paredes e divisão, uma vez que este aumento de volume está associado à intensa atividade citoplasmática.

Quatorze dias após o plaqueamento, no meio KM8p não houve alterações, sendo observado raríssimos alongamentos longitudinais (em cultura de 4 dias) que não evoluíram para divisão.

Para o meio GM, os tratamentos de 2 e 4 dias mostraram pouquíssimas células com aumento de volume e muitos protoplastos rompidos. Nos tratamentos de 6 e 8 dias, ocorreu aumento de volume em várias células, podendo ser observada intensa movimentação citoplasmática, concentrada ao redor do núcleo, embora não houvesse qualquer indício de divisão.

Para o meio N6, apenas o tratamento de 2 dias mostrou significativas divisões, embora em poucas células. Foram observadas cerca de 40 microcolônias de 4 a 8 células.

No meio R2 foram observados os melhores resultados no tratamento de 4 dias. Houve formação de várias colônias de células, atingindo até cerca de 30 células, mostrando ainda algumas isoladas entrando em processo de divisão (ver Figura 9). Os tratamentos de 6 e 8 dias mantêm-se estagnados, mas ainda se observa alguma movimentação citoplasmática.

As placas foram mantidas sem alteração e no 35º dia de cultivo, nova avaliação demonstrou um grande número de

microcalos nos tratamentos T4R2 (4 dias em meio R2), T2N6 (2 dias em meio N6) e microcalos em menor número nos tratamentos T8GM (8 dias em meio GM), T6R2 (6 dias em meio R2) e T8R2 (8 dias em meio R2).

Isso mostra que pelo menos no meio R2, a idade da cultura não se mostrou tão importante como foi apresentado em experimentos anteriores, para formação de calos, haja vista que o tratamento de 8 dias mostrou bom isolamento e formação de colônias e microcalos.

Após 40 dias, realizou-se a primeira transferência: o tratamento T4R2 foi inoculado (toda a camada de meio contendo os microcalos) em meio semi-sólido MR1, e mantido na luz. Passados 10 dias, a massa de calos, embora de aspecto friável, foi transferida para vários frascos contendo o mesmo meio de cultura. As demais placas com microcalos tiveram o mesmo tratamento após 50 dias.

Atualmente, todas têm demonstrado boa formação de calos, sendo que em alguns calos do tratamento T4R2 há pequenas extremidades arroxeadas, como já foi descrito na regeneração de plantas a partir de células.

4.3.3. Discussão

Analisando a literatura a que se teve acesso no decorrer deste trabalho e comparando-a com os resultados

obtidos, verifica-se que, em termos de cultivo de protoplastos, chegou-se a resultados semelhantes àqueles alcançados por MURAYAMA (1987). Esta autora, em sua dissertação, obteve calos no cultivo de protoplastos isolados a partir de uma suspensão celular cedida pelo Dr. A. MARETZKI (Hawaiian Sugar Planters' Association), sem data.

Comparando-se seus resultados em termos de produção de protoplastos, verifica-se que o rendimento obtido por MURAYAMA (1987) foi de cerca de 6.5×10^5 protoplastos, com uma solução enzimática contendo 2% de driselase, 2% de Celulase Cellulysin e 0.5% de Rhozyme HP150 (em 300 mg de células compactadas); um bom rendimento em função da quantidade de células tratadas.

A mesma autora escreve que não foi capaz de isolar protoplastos de suspensões celulares utilizando somente a enzima Celulase Onozuka R10. Resultado semelhante foi obtido neste trabalho, embora esta enzima estivesse acompanhada de outras.

Quanto à fase de crescimento da suspensão utilizada, embora MURAYAMA (1987) tenha quantificado o crescimento com base apenas no parâmetro peso seco, melhores resultados foram obtidos com suspensões subcultivadas a 4 dias. EVANS & COCKING (1977) recomendaram o mesmo tempo, alegando redução da produção de protoplastos de culturas mais velhas.

Neste trabalho, embora a produção de protoplastos na cultura de 8 dias tenha sido menor que as demais, isso não os inviabilizou para multiplicação. Esta afirmação encontra respaldo no trabalho de CHEN et alii (1988), que utilizaram suspensões de 6 a 9 dias com sucesso também na regeneração de plantas.

A prática de "plasmolisar" as células antes do tratamento com enzimas foi utilizada algumas vezes neste trabalho como forma de evitar danos na membrana (POWER et alii, 1989). Como não se observou diferenças em termos de rendimento de protoplastos, esta técnica foi dispensada.

As soluções enzimáticas empregadas, mostraram diferentes resultados entre si, mas também houve diferenças nos isolamentos utilizando uma mesma solução. Isso mostra a complexidade desta técnica, que por envolver muitos parâmetros e variáveis, torna praticamente impossível inferir conclusões a respeito de um ou outro tratamento. De maneira generalizada, a solução enzimática SE1, mostrou-se bastante eficiente em todos os isolamentos em que foi utilizada.

Divergências quanto às enzimas utilizadas em isolamento foram frequentes nos trabalhos consultados. Um exemplo é o emprego da enzima Pectolyase Y23, indispensável segundo GUIDERDONI (1985) e sem efeito, segundo MURAYAMA (1987). No presente trabalho, ela foi bastante positiva. Isso demonstra que há uma gama de possibilidades durante o

processo, e a repetição de resultados é muito difícil, já que o material vegetal sempre será diferente.

O comportamento dos protoplastos nos diferentes meios de cultivo testados deixou claro que o meio KM8p, muito utilizado em várias espécies, inclusive em cana-de-açúcar (CHEN et alii, 1988b e SRINIVASAN & VASIL, 1986), no presente trabalho não mostrou bons resultados. A utilização de meios como o R2, N6 e o GM, mostrou a possibilidade de se conseguir formação de colônias, o que não significa que sucessos futuros não possam ser alcançados com o meio KM8p.

Quanto às densidades de cultivo empregadas nesse trabalho, torna-se difícil concluir algo, já que o experimento instalado com esse objetivo foi praticamente perdido por contaminação. Acredita-se que aquela densidade utilizada no último experimento, cerca de 3.0×10^5 protoplastos / ml, tenha sido um pouco elevada, mas são encontrados na literatura, densidades maiores (SRINIVASAN & VASIL, 1986; TAYLOR et alii, 1992a e 1992b), iguais (CHEN et alii, 1987) e menores (EVANS et alii, 1980; GUIDERDONI, 1985).

A forma de cultivo em meio líquido ou em meio semi-sólido é bastante discutida. FITTER & KRIKORIAN (1982) preferem o cultivo em meio líquido devido à melhor aeração. EVANS & COCKING (1977) mostram como vantagem do cultivo em

gotas ou em finas camadas de meio semi-sólido, a possibilidade de acompanhar o desenvolvimento de colônias derivadas de protoplastos individuais e, conseqüentemente, determinar a eficiência de plaqueamento (proporção da população de protoplastos que formam colônia). A desvantagem seria a dificuldade em reduzir o potencial osmótico da cultura.

No presente trabalho, o meio semi-sólido apresentou bom resultado embora não se tenha analisado as duas formas comparativamente. Parece, a princípio, que a alegação de EVANS & COCKING (1977) tem mais procedência, já que o acompanhamento da cultura é indispensável. Quanto à redução do potencial osmótico, esta é uma prática discutível e, acredita-se, dispensável já que neste trabalho conseguiu-se a formação de colônias sem o uso dessa prática.

A viabilidade dos protoplastos, obtida pelo tratamento dos mesmos com azul de metileno, mostrou bons resultados, mas não foi realizado teste comparativo com diacetato de fluoresceína (FDA) para poder traçar comparações com outros resultados.

A porcentagem de regeneração de parede não foi quantificada por falta de equipamento, mas nos primeiros experimentos, o fenômeno de gemulação, bastante observado, pode estar associado a uma deposição irregular de celulose.

Quanto ao processo de divisão e formação de

colônias (ver Figura 9), constatou-se que o aumento de volume e a intensa atividade citoplasmática estão associados ao processo de divisão. Há uma tendência das organelas e grânulos presentes no citoplasma, concentrarem-se ao redor do núcleo, formando "estrias" perfeitamente visíveis.

As primeiras divisões celulares foram primeiramente observadas após 6 dias, embora raras. A partir do 14º dia é que elas se concentraram, estendendo até por cerca de 1 mês. A eficiência de plaqueamento não foi quantificada, mas pode-se dizer que ela foi relativamente baixa, cerca de 0.05 %, embora o processo de divisão tenha se estendido por cerca de 35 dias. Quatorze dias após o plaqueamento, o melhor tratamento (T4R2) apresentava apenas cerca de 90 colônias, visíveis a olho nu.

LARKIN (1982) constatou primeira divisão em 19 % dos protoplastos plaqueados e formação de colônias em 5 %. CHEN et alii (1987) obtiveram cerca de 60 colônias / gota de 30 μ l, atingindo uma eficiência de 0.5 %.

Como observação mais conclusiva, pode-se inferir que a não diferenciação dos calos formados em plantas, mesmo após transferência para meios de regeneração, pode estar relacionada com a incapacidade morfogênica da cultura utilizada como doadora de células.

O comportamento do material, seja na condição de células ou protoplastos, leva a crer que sempre haverá uma

- Figura 9. Isolamento e cultivo de protoplastos a partir de células em suspensão, var. SP 79-1011.
- 9a. Cultura em suspensão homogênea, em intensa divisão, com 4 dias de subcultivo.
  - 9b. Protoplastos recém-isolados.
  - 9c. Protoplasto mostrando aumento de volume e corrente citoplasmática em direção ao núcleo.
  - 9d. Primeira divisão celular.
  - 9e, 9f e 9g. Formação de colônia.
  - 9h. Calos transferidos para meio fresco.

9c

9d

9e

9f

9g

9h

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se estabelecer as seguintes conclusões:

- Culturas de células em suspensão de cana-de-açúcar das duas variedades estudadas podem manter seu potencial morfogênico, isto é, sua capacidade de diferenciação, por 5 meses.

- Culturas de células em suspensão de cana-de-açúcar são altamente eficientes em termos de produção de protoplastos após tratamento com diferentes soluções enzimáticas.

- O tratamento das células com uma solução plasmolizante é uma prática dispensável antes da digestão enzimática, na cultura da cana-de-açúcar.

- A redução do potencial osmótico da cultura

- A redução do potencial osmótico da cultura de protoplastos, como forma de favorecer a divisão celular é uma prática dispensável, já que a divisão ocorre independente deste procedimento.

- É possível a formação de calos a partir de protoplastos oriundos de células em suspensão para as duas variedades testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLOOWALIA, B.S. & MARETZKI, A. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. **Plant Cell Reports**, New York, 2: 21-5, 1983.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1992, Rio de Janeiro, 52: 554, 653, 1992.

BERGAMIN FILHO, A.; CARDOSO, C.O.N.; SANGUINO, A.; IRVINE, J.E.; SILVA, W.M. Carvão da cana-de-açúcar e sua epidemiologia. **Boletim Técnico Copersucar**, ed. especial, Piracicaba, 1987, 23p.

CHAGVARDIEFF, P.; BONNEL, E.; DEMARLY, Y. La culture "in vitro" de tissus somatiques de canne a sucre (*Saccharum* sp). **L'Agronomie Tropicale**, Paris, 36: 266-78, 1984.

CHEN, I. The inheritance of rice pollen plant and its application in crop improvement. In: HU, H. & YANG, H.I., ed. Haploids of higher plants "in vitro", Berlin, Springer-Verlag, 1986, p. 118-36.

CHEN, W.H.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, **39**: 251-61, 1988a.

CHEN, W.H.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Sugarcane protoplasts: factors affecting division and plant regeneration. *Plant Cell Reports*, New York, **7**: 344-7, 1988b.

CHEN, W.H.; SOTAK, R.; POWER, J.B.; COCKING, E.C.; DAVEY M.R. Eletrofusion of sugarcane-petunia protoplasts and the cocultivation of heterokaryons. *Report of Taiwan Sugar Research Institute*, Tainan, **1**: 15-20, 1989.

CHEN, W.H.; GARTLAND, K.M.A.; DAVEY, M.R.; SOTAK, R.; GARTLAND, J.S.; MULLIGAN, B.J.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimaeric gene. *Plant Cell Reports*, New York, **6**: 297-301, 1987.

CHOWDHURY, M.K.U. & VASIL, I.K. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and eletroporation of protoplasts. *Plant Cell Reports*, New York, 11: 494-8, 1992.

CHU, C. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, Peking, 1978. Proceedings. Peking, Science Press, 1978. p. 43-50.

COCKING, E.C. Oportunities from the use of protoplasts. *Philosophical Transaction Royal Society of London*, London, 292: 557-68, 1981.

COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Campanha integrada de controle do carvão em cana-de-açúcar. São Paulo, COPERSUCAR, 1985. 39 p.

CROCOMO, O.J. Cultura de tecidos: técnica auxiliar para o melhoramento da cana-de-açúcar. *Saccharum*, São Paulo, 15: 34-6, 1981.

D'AMATO, F. Chromosome number variation in culture cells and regenerated plants. In: THORPE, T.A., ed. **Frontiers of plant tissue culture**. Calgary, The International Association for Plant Tissue Culture, 1978. p. 287-95.

D'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS, A.V.P.; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, New York, **12**: 220-5, 1993.

EVANS, D.A.; CROCOMO, O.J.; CARVALHO, M.T.V. Protoplast isolation and subsequent callus regeneration in sugarcane. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, **98**: 355-8, 1980.

EVANS, P.K. & COCKING, E.C. Isolated plant protoplasts. In: STREET, H.E., ed. **Plant tissue and cell culture**. 2 ed. Berkeley, University of California Press, 1977. v.1, cap. 5, p. 103. (Botanical Monographs).

FITCH, M.M.M. & MOORE, P.H. Comparison of 2,4-D and picloran for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 20: 157-63, 1990.

FITCH, M.M.M. & MOORE, P.H. Long-term culture of embryogenic sugarcane callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 32: 335-43, 1993.

FITTER, M.S. & KRIKORIAN, A.D. **Plant protoplasts**. La Jolla, Hoechst, 1982. 21p.

FRANKS, T. & BIRCH, G. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, 18: 471-80, 1991.

FREARSON, E.M.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, New York, 33: 130-7, 1973.

FUJIMURA, T. & KOMAMINE, A. Fractionation of cultured cells. In: VASIL, I.K. ed., **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orlando, Academic Press, 1984. v. 1, cap. 19, p. 159-66.

GNANAPRAGASAM, S. & VASIL, I.K. Plant regeneration from a cryopreserved embryogenic cell suspension of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp.). **Plant Cell Reports**, New York, **9**: 419-23, 1990.

GUIDERDONI, E. Culture "in vitro" de cellules et de protoplastes de canne à sucre (*Saccharum* sp.). **L'Agronomie Tropicale**, Paris, **40**(4): 309-14, 1985.

GUIDERDONI, E. & DEMARLY, Y. Histology of somatic embryogenesis of sugarcane plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **14**: 71-88, 1988.

HENDRE, R.R.; IYER, R.S.; KOTWAL, M.; KHUSPE, S.S.; MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. **Sugarcane**, High Wycombe, **1**: 5-8. 1983.

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**, Leipzig, **118**: 169-80, 1983a.

HO, W.J. & VASIL, I.K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. **Annals of Botany**, Oxford, 51: 719-26, 1983b.

IRVINE, J.E. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 3: 201-9, 1984.

IRVINE, J.E. & BENDA, G.T.A. Sugarcane mosaic virus in plantlets regenerated from diseased leaf tissue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 5(19): 101-6, 1985.

KAO, K.N. & MICHAYLUK, M. Regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, 98: 135-41. 1975.

KARTHA, K.K. Meristem culture and cryopreservation - methods and applications. In: THORPE, T.A., ed. **Plant tissue culture; methods and applications in agriculture**. New York, Academic Press, 1981.
p. 181-211.

KHAN, B. M.; DWIVEDI, U.N.; RAWAL, S.K.; MASCARENHAS, A.F.

"In vitro" nitrate reductase activity in dark and light - growth sugarcane callus. **Plant Cell Reports**, New York, **3**: 138-41, 1984.

KING, P.J. Induction and maintenance of cell suspension cultures. In: VASIL, I.K., ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orlando, Academic Press, 1984. v.1, cap. 16, p. 130-8.

KRISHNAMURTHI, M. Isolation, fusion and multiplication of sugarcane protoplasts and comparison of sexual and parasexual hybridization. **Euphytica**, Wageningen, **25**: 145-50, 1976.

LARKIN, R.J. Sugarcane tissue and protoplasts culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **1**(3): 149-64, 1982.

LEE, T.S.G. Micropropagação de cana-de-açúcar através de cultura de meristema apical. **Saccharum**, São Paulo, **35**: 36-9, 1984.

LEE, T.S.G. Multiplication of sugarcane by apex culture. **Turrialba**, Turrialba, **36**: 231-6, 1986.

LIU, M.C. In vitro methods applied to sugarcane improvment.
In: THORPE, T.A., ed. **Plant Tissue Culture**; methods and
application in agriculture. New York, Academic Press,
1981. p. 297-301.

LIU, M.C. Sugarcane. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.;
AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell
culture crop species**. New York, Macmillan Publishing,
1984. v. 2, cap. 20, p. 572-605.

LIU, M.C. & CHEN, W.H. Histological studies on the origin
and process of plantlet differenciation in sugarcane
callus. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF
SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 15., Durban, 1974. **Proceedings**.
Durban, Hayne & Gibson, 1974. p. 118-28.

LOURENS, A.G. & MARTIN, F.A. Evaluation of "in vitro" propa-
gated sugarcane hybrids for somaclonal variation. **Crop
Science**, Madison, 27: 793-6, 1987.

MARETZKI, A. Tissue culture: its prospects and problems. In:
HEINZ, D.J., ed. **Sugarcane improvement through breeding**.
Amsterdam, Elsevier, 1987. p. 343-84.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, **15**: 473-9, 1962.

MURAYAMA, Y.M. Isolamento, cultivo e fusão de protoplastos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Piracicaba, 1987. 102p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP).

NADAR, H.M.; SOEPRAPTOPO, S.; HEINZ, D.J.; LADD, S.L. Fine structure of sugarcane (*Saccharum* sp.) callus and the role of auxin in embryogenesis. **Crop Science**, Madison, **18**: 210-6, 1978.

NICKELL, L.G. Crop improvement in sugarcane: studies using "in vitro" methods. **Crop Science**, Madison, **17**: 717-9, 1977.

OHIRA, K.; OJIMA, K.; FUJIWARA, A. Studies on the nutrition of rice cell culture. I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, **14**: 1113-21, 1973.

PEROS, J.P. & CHAGVARDIEFF, P. Mise en évidence "in vitro" d'effets toxiques entre *Ustilago scitaminea* Syd. et des cals de canne à sucre; influence de deux facteurs de croissance sur les phénomènes observés. *Agronomie, Paris*, 3(7): 629-34, 1983.

PEROS, J.P. & CHARGVARDIEFF, P. Toxic effect of *Ustilago scitaminea* on sugarcane callus. II. Culture filtrate action and comparision with the effects of *U. maydis* and kinetin. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Stuttgart, 94(3): 301-7, 1987.

PONCE, J.P. Cultivo de tejidos en la caña de azúcar. In: ROCA, W.M. & MROGINSKI, L.A., ed. *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Las Villas, CIAT, 1984. cap. 25, p. 543-75.

POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: 'assessment and perspectives. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 79: 125-34, 1990.

RATHUS, C. & BIRCH, R.G. Optimization of conditions for eletroporation and transient expression of foreign genes is sugarcane protoplasts. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 81: 65-74, 1992.

SILVAROLLA, M.B. Análise citológica de calos e plantas regeneradas "in vitro" de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Piracicaba, 1989. 160p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

SRINIVASAN, C. & VASIL, I.K. Callus formation and plantlet regeneration from sugarcane protoplasts isolated from embryogenic cell suspension cultures. **American Journal of Botany**, New York, 72(6): 833, 1985.

SRINIVASAN, C. & VASIL, I.K. Plant regeneration from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, 126(1): 41-8, 1986.

SREENIVASAN, J.; SREENIVASAN, T.V.; ALEXANDERK.C. Somaclonal variation for rust resistance in sugarcane. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, 47: 109-14, 1987.

STREET, H.E. Cell (Suspension) cultures - techniques. In: STREET, H.E., ed. **Plant Tissue and Cell Culture**, 2 ed. Berkeley, University of California Press, 1977. cap.4, p.61-102.

SUGIMOTO, A.; MATSUOKA, M.; YAMAGUCHI, I.; KATO, S. A simple method for morphogenic calli formation from protoplasts in sugarcane. *JARQ*, Ibaraki, 25: 289-93, 1992.

TAYLOR, P.W.J.; KO, H.; ADKINS, S.W. Factors affecting protoplast isolation and the regeneration of shoot-like structures from protoplast-derived callus of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). *Australian Journal of Botany*, Melbourne, 40: 863-76, 1992a.

TAYLOR, P.W.J.; ADKINS, S.W.; RATHUS, C.; BIRCH, R.G. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 28: 69-78, 1992b.

TOKESHI, H. Denças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F., coord. *Manual de Fitopatologia*. São Paulo, Agronômica Ceres, 1980. v. 2, p. 141-260.

VASIL, I.K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 128: 193-218, 1987.

VASIL, I.K. & VASIL, V. Regeneration in cereal and other grass species. In: VASIL, I.K., ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orlando, Academic Press, 1986. v. 3, p. 121-50.

VASIL, V. & VASIL, I.K. Isolation and culture of cereal protoplasts. Part.2. Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 56: 97-9, 1980.

APÊNDICE 1

MEIOS DE CULTURA

Meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Componentes	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
KI	0,83
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	33,6
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina.HCl	0,5
Tiamina.HCl	0,1
Sacarose	30000
pH	5,6

Meio de Cultura GM (General Medium) (CHEN, 1986), utilizado por LI & MURAI (1990), para protoplastos.

Componentes	mg/l
KNO ₃	3000
NH ₄ H ₂ PO ₄	400
CaCl ₂ .2H ₂ O	166
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
NaFeEDTA	42,1
MnSO ₄ .4H ₂ O	4,4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5
H ₃ BO ₃	1,6
KI	0,8
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Tiamina.HCl	1,0
Piridoxina.HCl	0,5
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	2,0
2,4-D	1,0
Sacarose	30000
pH	5,6

Meio de Cultura R2 (OHIRA et alii, 1973)

Componentes

NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,0 mM
KNO ₃	40 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,0 mM
FeEDTA	Fe; 2,5 mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	Mn; 0,50 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Zn; 0,50 mg/l
H ₃ BO ₃	B; 0,50 mg/l
CuSO ₄	Cu; 0,05 mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Mo; 0,05 mg/l
Tiamina.HCl	1,0 mg/l
2,4-D	2,0 mg/l
Sacarose	20 g/l
pH	6,0

Meio de Cultura N6 (CHU, 1978).

Componentes	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	463
KNO ₃	2830
KH ₂ PO ₄	400
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
CaCl ₂ .2H ₂ O	166
MnSO ₄ .4H ₂ O	4,4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5
H ₃ BO ₃	1,6
KI	0,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,25
Glicina	2,0
Tiamina.HCl	1,0
Piridoxina.HCl	0,5
Ácido nicotínico	0,5
Sacarose	50000-120000
pH	5,8

Meio de Cultura KM8 e KM8p (Kao & Michayluk, 1975).

Componentes	mg/l
NH ₄ NO ₃	600
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	600
MgSO ₄ .7H ₂ O	300
KH ₂ PO ₄	170
KCl	300
FeEDTA	33,6
KI	0,75
H ₃ BO ₃	3,0
MnSO ₄ .4H ₂ O	10,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0
NaMoO ₄	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Inositol	100
Ácido nicotínico	1,0
Piridoxina.HCl	1,0
Tiamina.HCl	1,0
Pantotenato de Ca	1,0
Ácido ascórbico	2,0
Cloreto de colina	1,0
(continua...)	

Meio de Cultura KM8 e KM8p, cont.

p-aminobenzóico	0,02
Biotina	0,01
Riboflavina	0,2
Ácido fólico	0,4
Vitamina A	0,01
Vitamina D ₃	0,01
Vitamina B ₁₂	0,02
Piruvato de Sódio	20,0
Ácido cítrico	4,0
Ácido fumárico	40,0
Ácido málico	40,0
Frutose	250,0
Ribose	250,0
Xilose	250,0
Mannose	250,0
Rhamnose	250,0
Cellobiose	250,0
Sorbitol	250,0
Manitol	250,0
Caseína hidrolisada	250,0
Água de coco	20 ml/l
Sacarose	20 (KM8) e 250 (KM8p)
Glucose	10 (KM8) e 100 (KM8p)
pH	5,8

Solução de CPW (FREARSON et alii, 1973).

Componentes	mg/l
KH_2PO_4	27,2
KNO_3	101,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1480,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,0
KI	0,16
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025