

ENHANCED *IN VITRO* REGENERATION IN SUGARCANE (*SACCHARUM OFFICINARUM* L.) BY USE OF ALTERNATE HIGH-LOW PICLORAM DOSES AND THIDIAZURON SUPPLEMENTATION

M.S. AKRAM^{1,2,*}, A.K. ALVI³, J. IQBAL¹

¹ School of Biological Sciences, University of the Punjab (54590), Lahore, Pakistan

² Department of Botany, Government College University (38000) Faisalabad, Pakistan

³ Department of Botany, Government College Women University Faisalabad, Pakistan

E-mail: sohailakram79@gmail.com

Sugarcane is an important domestic and industrial crop and considerable efforts have been made to improve its yield through conventional as well as biotechnological approaches. Genetic manipulation of sugarcane is dependent on an efficient reproducible in vitro regeneration regime. In the current study, the role of explant position, induced desiccation, picloram (PIC) levels for callogenesis as well as thidiazuron (TDZ) addition during regeneration phase has been appraised. Using an optimum combination of mentioned factors, an enhanced in vitro regeneration system has been established for two elite sugarcane cultivars. Embryogenesis was stimulated in cv. HSF-240 by MS medium augmented with 12.42 μM PIC while cv. CPF-237 exhibited somatic embryo formation when PIC supplementation was combined with induced desiccation (using 12 g L⁻¹ agar). A decrease in embryogenesis frequency was recorded from base towards tip. The explants cultured alternately on high (12.42 μM) and low (4.14 μM) PIC medium produced the highest number of nodular calli which later exhibited maximum regeneration potential. Optimal shoot initiation was observed with 9.08 μM TDZ followed by medium having 2.27 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid plus 4.43 μM benzylaminopurine. However, the shoots produced with former medium composition showed frailty as compared to the one regenerated on later medium. Healthy roots were initiated with 16.11 μM naphthalene acetic acid in the presence of 0.5 % activated charcoal. Malondialdehyde content, catalase and peroxidase activity of in vitro and field grown sugarcane plants were analogous, indicating that the in vitro regenerated plants were equally fit for subsequent growth in natural conditions. The reported protocol can be helpful in devising strategies for a robust sugarcane genetic engineering regime.

© M.S. AKRAM, A.K. ALVI, J. IQBAL, 2021

Key words: Auxins, Callogenesis, Explant; Growth regulators, Somatic embryogenesis.

ПОКРАЩЕННЯ *IN VITRO* РЕГЕНЕРАЦІЇ ЦУКРОВОЇ ТРОСТИНИ (*SACCHARUM OFFICINARUM* L.) ЗА ДОПОМОГОЮ ЗМІННИХ ВИСОКИХ-НИЗЬКИХ ДОЗ ПІКЛОРАМУ І ДОДАВАННЯ ТІДІАЗУРОНУ

Цукрова тростина – це важлива рослина для внутрішнього використання та промислового виробництва в країні. Було докладено значних зусиль для покращення її продуктивності за допомогою традиційних та біотехнологічних підходів. Генетичні маніпуляції з цукровою тростиною залежать від ефективності відтворюваного режиму *in vitro* регенерації. У цьому дослідженні оцінювали роль положення експланта, індукованого пересихання, рівнів піклораму (PIC) у калюсогенезі, а також важливість додавання тідіазурону (TDZ) впродовж фази регенерації. Оптимальне поєднання вищевказаних факторів дозволило визначити покращену систему *in vitro* регенерації для двох відбірних сортів цукрової тростини. Ембріогенез сорту HSF-240 стимулювали за допомогою MS середовища з додаванням 12,42 мкМ PIC, у той час як сорт CPF-237 продемонстрував соматичний ембріогенез, коли додавання PIC поєднували з індукованим пересиханням (за допомогою 12 г л⁻¹ агару). Було зафіксовано зниження частоти ембріогенезу від основи до верхівки. Експланти, вирощені змінно на середовищі з високим (12,42 мкМ) і низьким (4,14 мкМ) вмістом PIC, виробили найбільшу кількість нодулярних калюсів, які згодом показали максимальний регенераційний потенціал. Оптимальне формування пагонів спостерігали при 9,08 мкМ TDZ, середні значення були зафіксовані при 2,27 мкМ 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти з додаванням 4,43 мкМ бензиламінопурину. Однак, пагони, сформовані з першим складом середовища, продемонстрували ламкість порівняно з пагонами, регенерованими на другому середовищі. Здорові корені формувалися за допомогою 16,11 мкМ нафталіноцтової кислоти у присутності 0,5 % активованого вугілля. Вміст малонового діальдегіду, активність каталази і пероксидази *in vitro* та у рослин цукрової тростини, вирощених у польових умовах, були аналогічними, що вказує на те, що *in vitro* регенеровані рослини були рівноцінно здатними до подальшого вирощування у природних умовах. Заявлений протокол може бути корисним для розробки стратегій щодо повноцінного режиму генетичної інженерії цукрової тростини.

Ключові слова: ауксини, калюсогенез, експлант, регулятори росту, соматичний ембріогенез.

REFERENCES

- Aebi H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Aftab F, Iqbal J. (1999) Plant regeneration from protoplasts derived from cell suspension of adventive somatic embryos in sugarcane (*Saccharum sp hybrid* cv CoL-54 and cv CP-43/33). *Plant Cell Tissu Organ Cult* 56:155–162
- Aftab F, Zafar Y, Malik KA, Iqbal J. (1996) Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts in sugarcane (*Saccharum spp hybrid* cv CoL-54). *Plant Cell Tissu Organ Cultu* 44:71–78
- Ali A, Naz S, Siddiqui FA, Iqbal J. (2008) Rapid clonal multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum*) through callogenesis and organogenesis. *Pak J Bot* 40:123–138
- Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix PJ, Fauquet C et al. (2005) Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Mol Breed* 15:305–327
- Chance B, Maehly AC. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* 2:764–775
- Charleson RP, Stephen CW, Matthew AJ. (2006) Adventitious shoot regeneration of scotch spearmint (*Mentha × Gracilis* Sole). *In Vitro Cellu Develop Biol-Plant* 42:354–358
- Chengalrayan K, Abouzid A, Gallo-Meagher M. (2005) *In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed derived callus. *In Vitro Cellu Develop Biol-Plant* 41:477–482
- Chengalrayan K, Gallo-Meagher M. (2001) Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. *In Vitro Cellu Develop Biol-Plant* 37:434–439
- Croft BJ, Magarey RC, Allsopp PG, Cox MC, Willcox TG, Milford BJ, Wal ES et al. (2008) Sugarcane smut in Queensland: arrival and emergency response. *Austral Plant Pathol* 37:26–34
- Dhawan AK, Moudgil R, Dendsay JPS, Mandhan RP. (2004) Low thidiazuron levels promote and sustain shoot-let multiplication in sugarcane. *Ind J Plant Physiol* 9:354–359
- Economic Survey of Pakistan, Government of Pakistan, Ministry of Food and Agriculture Islamabad (2017–2018) 18
- Gallo-meagher M, English RG, Abouzid A. (2000) Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. *In Vitro Cellu Develop Biol-Plant* 36:37–40
- Garcia R, Cidade D, Castellar A, Lip A, Magioli C, Callado C, Mansur E. (2007) *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugar cane are determined by light and type of growth regulator. *Plant Cell Tissu Organ Cult* 90:181–190
- Gill R, Malhotra PK, Gosal SS. (2006) Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. *Plant Cell Tissu Organ Cult* 84:100205–100209
- Grossmann K. (2000) Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends Plant Sci* 5:506–509
- Heath RL, Packer L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198
- Hotta CT, Lembke CG, Domingues DS et al. (2010) The biotechnology roadmap for sugarcane improvement. *Trop Plant Biol* 3:75–87
- Jain M, Chengalrayan K, Abouzid A, Gallo-Meagher M. (2007) Prospecting the utility of a PMI/mannose selection system for the recovery of transgenic sugarcane (*Saccharum sp hybrid*) plants. *Plant Cell Reports* 26:581–590
- Kaur A, Gosal SS. (2009) Desiccation of callus enhances somatic embryogenesis and subsequent shoot regeneration in sugarcane. *Ind J Biotechnol* 8:332–334
- Kaur R, Kapoor M. (2016) Plant regeneration through somatic embryogenesis in sugarcane. *Sugar Tech* 18:93–99
- Kumari K, Lal M, Saxena S. (2017) Enhanced micropropagation and tiller formation in sugarcane through pretreatment of explants with thidiazuron (TDZ). *3 Biotech* 7:282
- Lakshmanan P, Geijskes RJ, Aitken KS, Grof CLP, Bonnett GD, Smith GR. (2005) Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cellu Develop Biol-Plant* 41:345–363
- Lakshmanan P, Geijskes RJ, Wang LF, Elliott A, Grof CPL, Berding N, Smith, GR. (2006) Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum sp interspecific hybrids*) leaf culture. *Plant Cell Reports* 5:1007–1015
- Mamun MA, Sikdar MBH, Paul DK, Rahman MM, Islam MR. (2004) *In vitro* micropropagation of some important sugarcane varieties of Bangladesh. *Asian J Plant Sci* 3:666–669
- Munir N, Aftab F. (2009) The role of polyethylene glycol (PEG) pretreatment in improving sugarcane's salt (NaCl) tolerance. *Turk J Bot* 33:407–415
- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497
- Ramanand Kureel N, Subhanand N, Lal M, Singh SB. (2006) Plantlet regeneration through leaf callus culture in sugarcane. *Sugar Tech* 8:85–87

- Rikiishi K, Matsuura T, Maekawa M, Takeda K. (2008) Light control of shoot regeneration in callus cultures derived from barley (*Hordeum vulgare* L) immature embryos. *Breed Sci* 58:129–135
- Snyman SJ, Meyer GM, Richards JM, Haricharan N, Ramgareeb S, Hockett BI. (2006) Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. *Plant Cell Reports* 25:1016–1023
- Taiz L, Zeiger E. (2010) *Plant Physiology* (Fifth Edition) Sinauer Associates Inc. Sunderland Massachusetts USA
- Thomas TD. (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv* 26:618–631
- Tiel K, Enríquez GA, Ceballo Y, Soto N, Fuentes AD, Ferreira A, Coll Y, Pujol M. (2006) Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Saccharum officinarum* L) meristematic tissue. *Biotechnol Applic* 23:22–24

Received December 19, 2019

Received June 05, 2020

Accepted November 18, 2021