

Avaliação *in vitro* de acessos de *Saccharum* à tolerância ao alumínio

NASCIMENTO, Lucas Henrique Andrade¹; OLIVEIRA, Leila Albuquerque Resende de²; SANTANA, Fernanda Vieira³; MALSCHITZKY, Sofia Amaral⁴; MORAES, Lizz kezzy de⁵; LEDO, Ana da Silva⁶

¹ Graduando em Engenharia Agrônoma, bolsista Pibic/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

² Engenheira Florestal, doutora em Agricultura e Biodiversidade, PPGAGRI/UFS, São Cristóvão, SE.

³ Engenheira Florestal, mestre em Agricultura e Biodiversidade, PPGAGRI/UFS, São Cristóvão, SE.

⁴ Graduanda em Engenharia Agrônoma, bolsista Pibic/FAPITEC-SE/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵ Engenheira Agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁶ Engenheira Agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Resumo - O Brasil se destaca no cenário mundial quanto à produção de energia renovável. Neste sentido, a pesquisa tem despertado grande interesse pelas biomassas que apresentam grande potencial energético e vem buscando incessantemente por cultivares mais produtivas sob condições desfavoráveis. Dentre as biomassas utilizadas e de maior potencial para produção de energia, a cana-de-açúcar destaca-se no cenário nacional. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar dois acessos: *Saccharum officinarum* e *Miscanthus* spp., do complexo *Saccharum* do BAGCana da Embrapa, quanto à tolerância ao estresse abiótico de toxidez por alumínio, em condições de cultivo *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju. Foram utilizadas brotações adventícias, cultivadas em meio Murashige e Skoog líquido, suplementado com 2% de sacarose, na presença de cinco concentrações (0, 200, 400, 600, 800 μ M) de $AlCl_3$. Número de brotações, comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da raiz e da parte aérea, teor de prolina e clorofilas A, B e total foram analisados. *Saccharum officinarum* apresentou maior comprimento de raízes, massa seca e fresca da parte aérea e menores teores de prolina frente a toxidez de alumínio, apresentando assim maior tolerância que o acesso *Miscanthus* sp.

Termos para indexação: *Saccharum officinarum*, *Miscanthus* spp., Cana-de-açúcar, Seleção *in vitro*.

Introdução

A procura e necessidade de novas fontes de energias renováveis é o objetivo de grande parte das nações do mundo, para a diminuição do uso da energia fóssil, grande causadora de poluição atmosférica. A acessão pelas biomassas e produção de energia terá que estar adepta à proteção dos ecossistemas e a garantia da segurança alimentar. Portanto, faz-se necessário a busca por genótipos adaptados de espécies produtoras de biomassas que possam se expandir para áreas de baixa acessibilidade hídrica (Azevedo e Lea, 2011; Carr; Knox, 2011) e que possuam solos com salinidade e acidez (Vasconcelos et al., 2013). Vale ressaltar que, regiões com acidez de solo costumam apresentar alumínio em sua composição.

A presença do alumínio na composição do solo é um fator limitante para o desenvolvimento das plantas, pois reduz o crescimento radicular e dificulta a absorção de água e nutrientes, contribuindo para a baixa produção agrícola. Dessa forma, para obtenção de melhores rendimentos faz-se necessário o uso de tecnologias para melhorias do solo ou da parte genética das plantas (Echart; Cavalli-Molina, 2001). A cultura de tecidos é de suma importância para otimizar a interação de fatores abióticos e bióticos, pois permite mais rapidez e segurança na regeneração e propagação de material melhorado.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os acessos *Saccharum officinarum* e *Miscanthus* spp. do BAG *Saccharum* da Embrapa, quanto à tolerância ao estresse abiótico de toxidez por alumínio em condições de cultivo *in vitro*.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe. Como material vegetal, foram utilizadas brotações dos acessos *Saccharum officinarum* (acesso 101 – clone Q45866) e *Miscanthus* spp. (acesso 114 – clone Fiji_15), parte do Banco ativo de Germoplasma de *Saccharum* da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Nossa Senhora das Dores - Sergipe. A cada trinta dias, as culturas foram transferidas para frascos com capacidade de 250 mL, contendo 30 mL de meio de multiplicação (MM), constituído de sais do meio

de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 2% de sacarose, 0,3 mg L⁻¹ de BAP, 0,15 mg L⁻¹ cinetina, e 4 g L⁻¹ de gelificante. As culturas foram subcultivadas por 6 meses, para atingir o número suficiente de brotações, para os ensaios experimentais. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura ambiente de 25 ± 2 °C, 60 ± 5% de umidade relativa e intensidade luminosa de 60 μmol m⁻² s⁻¹, com 14 h de fotoperíodo.

No *screening in vitro*, quanto a tolerância ao alumínio, foi utilizada a metodologia adaptada de Cançado et al. (2009). Brotações adventícias de 3 cm, enraizadas dos acessos oriundas do segundo subcultivo foram transferidas para meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) líquido, com base de suporte de isopor esterilizado, suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose, em cinco diferentes concentrações de Cloreto de Alumínio (AlCl₃): 0; 200, 400, 600 e 800 μM, com pH ajustado para 4.2. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, sob condições de dia longo (16/8 h ciclo de luz/escuro), a uma temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 60 ± 5% de umidade relativa e intensidade luminosa de 60 μmol m⁻² s⁻¹.

Para o enraizamento, brotações foram inoculadas em meio de cultura MS, suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose, 0,7 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), gelificado com 1,5 g L⁻¹, e pH ajustado para 5.8. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, nas condições anteriores, até atingirem 1 cm de raiz.

Aos 30 dias, foram realizadas avaliações biométricas (número de brotações, comprimento da parte aérea e do sistema radicular), matéria fresca e seca da parte aérea e raiz. Para obtenção do resultado do crescimento de parte aérea e raiz foi realizada a subtração entre o comprimento aos 30 e 0 dias (no início do experimento). Para obtenção das massas secas, cada parte vegetativa foi seca em estufa de aeração forçada a 60 °C, até atingir peso constante. A análise de teor de prolina das folhas foi realizada de acordo com o método de Bates et al. (1973) e os conteúdos de clorofila a (Cl a), Clorofila b (Cl b) e clorofila total (CT) foram realizados de acordo com o método de Shabala et al. (1998).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5 (2 acessos x 5 níveis de Alumínio) em cinco repetições. Para os níveis de AlCl₃, os dados das variáveis foram submetidos a análise de regressão, com ajuste de equações e para os acessos as médias foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para as análises foi utilizado o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

Resultados e discussão

Houve efeito significativo dos acessos no comprimento de parte aérea, comprimento de raízes e número de brotações. Não houve efeito significativo dos níveis de alumínio e a sua interação com o fator acessos para essas variáveis. Segundo Rossiello e Jacob Neto (2006), o alumínio tóxico, desenvolve alterações no sistema radicular das plantas, diminuindo a massa e o tamanho das raízes. Assim, quanto ao desenvolvimento radicular, o acesso *Miscanthus* spp. (Fiji_15) foi mais sensível a presença do alumínio, quando comparado a *Saccharum officinarum* (Q45866) (Tabela 1). Por sua vez, ao utilizar dez concentrações crescentes de Al em solução nutritiva em cana-de-açúcar Oliveira (2012) observou queda no crescimento radicular, somente quando a concentração foi maior que 500 μmol L⁻¹.

Tabela 1. Comprimento de parte aérea (CPA) e raízes (CRA), e número de brotações (NUB) de acessos de *Saccharum*, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, sob estresse por toxidez de alumínio.

Acessos	CPA (cm)	CRA (cm)	NUB
101 – <i>Saccharum officinarum</i> (Q45866)	10,04 b	4,54 a	4,32 a
114 - <i>Miscanthus</i> spp. (Fiji_15)	20,32 a	1,96 b	2,08 b
CV (%)	27,65	21,11	55,81

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p >0,05).

Em relação à biomassa, houve efeito isolado de acessos e níveis de alumínio para massa fresca e seca da parte aérea. O acesso 101 – *S. officinarum* (Q45866) apresentou melhor desenvolvimento vegetativo em parte aérea que o acesso 114 (Tabela 2). Para massa fresca e seca da raiz, não foram detectados efeitos significativos dos acessos e níveis de alumínio. O comportamento da massa fresca de

parte aérea em função dos níveis de alumínio foi linear negativo ($y = -0,0002x + 0,4165$; $R^2 = 0,5172$), enquanto para massa seca da parte aérea foi quadrático ($y = 6E-08x^2 - 7E-05x + 0,0462$; $R^2 = 0,9667$).

Tabela 2. Massa fresca da parte aérea (MFPA) e do sistema radicular (MFRA) e massa seca da parte aérea (MSPA, g) e do sistema radicular (MSRA) de acessos de *Saccharum* aos 30 dias de cultivo *in vitro*, sob estresse por toxidez de alumínio.

Acessos	MFPA (g)	MSPA (g)	MFRA (g)	MSRA (g)
101 – <i>S. officinarum</i> (Q45866)	0,4828 a	0,0459 a	0,1210 a	0,0089 a
114 - <i>Miscanthus</i> spp. (Fiji_15)	0,2029 b	0,0210 b	0,1337 a	0,0093 a
	MFPA (g)	MSPA (g)		
	$y = -0,0002x + 0,4165$	$y = 6E-08x^2 - 7E-05x + 0,0462$		
R^2	0,5172		0,9667	
CV (%)	44,08	38,96	44,39	41,8

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Segundo Sousa (2018), em pesquisa com a cana-de-açúcar cultivada em sistema hidropônico, a maior concentração de alumínio no meio (70 mg L^{-1}), não foi considerada letal. Entretanto, os níveis avaliados no presente estudo foram bem superiores, induzindo um comportamento linear negativo e de segundo grau à massa fresca da parte aérea e à massa seca da parte aérea, respectivamente.

Houve efeitos isolados dos fatores acessos e níveis de alumínio na produção de prolina. O acesso 114 (*Miscanthus* spp.) produziu maior quantidade de prolina na presença de níveis de AlCl_3 a partir de $400 \mu\text{M}$, provavelmente por sua maior sensibilidade ao Al, exigindo maior produção de prolina como defesa. Os teores de prolina em função dos níveis de alumínio, seguiram um comportamento quadrático nos dois acessos (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de prolina em acessos de *Saccharum* aos 30 dias de cultivo *in vitro*, sob estresse por toxidez de alumínio.

AlCl_3 (μM)	Acessos	
	Acesso 101 <i>Saccharum officinarum</i>	Acesso 114 <i>Miscanthus</i> spp.
	Prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa fresca)	
0	76,31 a	58,65 b
200	57,72 a	51,38 b
400	59,92 a	60,56 a
600	55,71 a	66,70 a
800	65,07 b	81,43 a
	$y=0,000353x^2-0,1658x+74,91$	$y=0,00029x^2-0,0561x+57,42$
R^2	0,8638	0,9608
CV (%)	39,38	

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Para clorofila A e total, houve efeito isolado dos acessos e níveis de alumínio, para clorofila B, apenas efeito dos acessos. O acesso *Miscanthus* spp. (Fiji_15) produziu maior quantidade de clorofila, diferindo estatisticamente de *Saccharum officinarum* (Q45866) (Tabela 4). A clorofila A e a clorofila total, em função dos níveis de alumínio, seguiram um modelo linear crescente de, respectivamente, $y=0,0003x + 0,3907$, $R^2 = 0,799$ e $y=0,0003x + 0,5062$; $R^2 = 0,8103$.

Tabela 4. Teores de Clorofila A, B e Total em acessos de *Saccharum* aos 30 dias de cultivo *in vitro*, sob estresse por toxidez de alumínio.

Acessos	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila Total
101 – <i>Saccharum officinarum</i> (Q45866)	0,400 b	1,1256 b	0,525 b
114 - <i>Miscanthus</i> spp. (Fiji_15)	0,606 a	1,2434 a	0,719 a
	Clorofila A	Clorofila Total	
	$y=0,0003x + 0,3907$	$y=0,0003x + 0,5062$	
R ²	0,799	0,8103	
CV (%)	16,11	3,36	12,69

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Conclusões

O Acesso Q45866 (*Saccharum officinarum*) apresentou maior comprimento de raízes e número de brotações, além de maior massa seca e fresca da parte aérea e menores teores de prolina, frente a toxidez de alumínio, apresentando assim maior tolerância que o acesso *Miscanthus* sp.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Embrapa Tabuleiros Costeiros e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências bibliográficas

- AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J. Research on abiotic and biotic stress - what next? **Annals of Applied Biology**, v. 159, p. 317–319, 2011.
- BATES L. S.; WALDREN R. P.; TEARE I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205–207, 1973.
- CANÇADO, G. M. C.; RIBEIRO, A. P.; PIÑEROS, M. A.; MIYATA, L. Y.; ALVARENGA, Â. A.; VILLA, F.; PASQUAL, M.; PURGATTO, E. Evaluation of aluminium tolerance in grapevine rootstocks. **Vitis**, v. 48, n. 4, p. 167–173, 2009.
- CARR, M. K. V.; KNOX, J. W. The water relations and irrigation requirements of sugar cane (*Saccharum officinarum*): a review. **Experimental Agriculture**, v. 47, p. 1–25, 2011.
- ECHART, C. L.; CALVANLLI- MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos mecânico de tolerância e seu controle genético. **Revista Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 531-541, 2001.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, M. Z. **Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) à toxidez por alumínio em solução**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado) - UFSCAR, 2012.
- ROSSIELLO, R. O. P.; JACOB-NETTO, J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: FERNANDES, M. S. (ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2006. p. 375-418.
- SHABALA, S. N.; SHABALA, S. I.; MARTYENKO, A. I.; BABOURINA, O.; NEWMAN, I. A. Salinity effect on bioelectric activity, growth, Na⁺ accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves: a comparative survey and prospects for screening. **Australian Journal Plant Physiology**, v. 25, p. 609–616, 1998.
- SOUSA, F. B. F. de. **Tolerância de genótipos de cana-de-açúcar a toxidez por alumínio, manganês e baixa disponibilidade de nutrientes**. Dissertação. Mestrado em Ciências do Solo) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Jaboticabal, 2018.

VASCONCELOS, R. R. A. de; BARROS, M. F. C.; SILVA, E. F. e; et al. Características físicas de solos salino-sódicos do semiárido pernambucano em função de diferentes níveis de gesso. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1318-1325, 2013.