

**EFICIÊNCIA DE AGENTES DESINFESTANTES EM EXPLANTES DE CANA-DE-AÇÚCAR
PARA INTRODUÇÃO EM CULTIVO *In vitro***

Maurício Marini Köpp¹, Leônidas Paixão Passos¹, Maria Coletta Vidigal¹, Naine Martins do Vale²,
Leiri Daiane Barili², Gislayne A. Rodrigues Kelmer³, Aline Luciano Filgueiras³

¹ Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – CNPGL, Juiz de Fora, MG. e-mail: kopp@cnpgl.embrap.br

² Acadêmica do Curso de Agronomia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV, Lages, SC.

³ Acadêmica do Curso de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora, MG.

Resumo: A cana-de-açúcar é muito cultivada para obtenção do açúcar, álcool e também vem sendo utilizada na alimentação animal como fonte de energia. Sua propagação é realizada na forma de estacas e mudas o que dificulta sua multiplicação. Desta forma, a técnica de micro-propagação que permite a obtenção de um grande número de mudas num curto espaço de tempo, é uma importante ferramenta que viabiliza a rápida propagação inicial de variedades de cana. Porém para a obtenção de mudas de boa qualidade sanitária é essencial que seja realizada uma desinfestação adequada dos explantes para introdução *in vitro*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de três agentes desinfestantes para explantes de cana-de-açúcar, a fim de elaborar um protocolo de desinfestação para a introdução em cultivo *in vitro*. Para a desinfestação foram utilizadas as soluções de hipoclorito de sódio 1% por 30 minutos, cloreto de benzalcônio 0,1% e cloreto de mercúrio 1% por 20 minutos, posteriormente os explantes foram introduzidas em meio de cultivo. Foi observado que o cloreto de mercúrio apresentou a melhor eficiência na desinfestação de explantes e o melhor índice de sobrevivência encontrado ocorreu quando tratados com cloreto de benzalcônio.

Palavras-chave: contaminação, micro-propagação, *Saccharum officinarum*

Efficiency of disinfectant compounds for *in vitro* introduction of sugarcane explants

Abstract: Besides being widely grown for sucrose and ethanol production, sugarcane is utilized in animal feeding systems as an energy source. The propagation of the species is usually carried out through cuttings and seedlings, what poses a limit to the extent to which the multiplication of desirable materials can be achieved. Such a constraint has been overcome by means of *in vitro* micropropagation, with the additional advantage of yielding seedlings in a relatively short period of time. However, in such approaches, it is essential that the disinfection procedure of explants be efficient. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the efficiency of three disinfectant compounds on sugarcane explants, in order to improve the protocol for *in vitro* culturing initiation. Explants were exposed to the following treatment solutions and respective periods of immersion: 1% sodium hypochlorite, 30 min; 0.1% benzalkonium chloride, 20 min; and 1% mercury chloride, 20 min, prior to their introduction in the culture medium. It was observed that mercury chloride had the best disinfection efficiency. On the other hand, the best explants survival rate was achieved with benzalkonium chloride.

Keywords: contamination, micropropagation, *Saccharum officinarum*

Introdução

A cana-de-açúcar, (*Saccharum officinarum*), é muito cultivada em países tropicais e subtropicais para obtenção do açúcar, do álcool e da aguardente, além da crescente utilização como recurso forrageiro sendo utilizada na alimentação animal como fonte de energia (NUSSIO et al., 2007). A baixa eficiência dos métodos de produção de mudas de cana-de-açúcar torna sua propagação inicial lenta e seu custo elevado, inviabilizando a utilização de variedades melhoradas pelos produtores de menor poder aquisitivo.

A micro-propagação vem sendo utilizada para reduzir o tempo na produção de mudas de boa qualidade e livres de doenças (MONTARROYOS, 2000). Dentre as etapas da micro-

propagação a desinfestação têm apresentado baixa eficiência, pois deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal sem danificar e inviabilizar o mesmo.

Alguns dos agentes utilizados para a desinfestação de explantes são: cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio e, os mais comumente utilizados como, hipoclorito de cálcio e de sódio (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), onde suas concentrações variam de acordo o tipo do explante.

Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de desinfestação de três agentes desinfestantes para explantes de cana-de-açúcar, a fim de elaborar um protocolo de desinfestação para a introdução de cana-de-açúcar em cultivo *in vitro*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal pertencente à Embrapa Gado de Leite, na cidade de Juiz de Fora, MG.

Foram utilizados explantes (meristemas axilares) de plantas jovens de quatro genótipos de cana-de-açúcar (1-Santa Isabel, 2-São José, 3-IAC 862480 e 4-IAC 862210), coletados em casa de vegetação. Na desinfestação os explantes foram imersos em álcool 70% (v/v) por cinco minutos, e posteriormente submetidos aos seguintes agentes de desinfestação segundo Sousa et al. (2007): hipoclorito de sódio (Cl) 1% por um período de 30 minutos, cloreto de benzalcônio (Bz) 0,1% e cloreto de mercúrio (Hg) 1% por 20 minutos, seguida de três lavagens em água destilada estéril. Para a indução de brotações foi utilizado o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), contendo 0,6% de ágar, 3% de sacarose e suplementado com 2 μmol 6-benzilaminopurina (BAP) e 1 μmol ácido naftalenoacético (ANA) em delineamento inteiramente casualizado com três repetições mantidas em câmara com controle ambiental (240 mol/s.m² de irradiância, 30 \pm 4°C, 86 \pm 4% de U.R. e 14 horas de fotoperíodo).

O experimento foi avaliado 15 dias após a introdução, as variáveis observadas foram: i) número de explantes contaminados; ii) número de sobrevivência de explantes e iii) número de explantes oxidados. Os resultados foram submetidos a análise de variância considerando agentes de desinfestação e genótipo como fatores fixos. Os efeitos da interação entre estes fatores foram testados através de teste de comparação de médias (Tukey $p \leq 5\%$) entre agentes nos diferentes níveis do fator genótipo, sendo apresentados na forma de gráficos e a respectiva significância das comparações de médias.

Resultados e Discussão

Pode ser observado na Figura 1 que os genótipos apresentam respostas diferenciais em relação a tolerância a cada agente desinfestante, corroborando os resultados de Sousa et al. (2007) que determinaram diferentes agentes para desinfestação de acessos de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*.

De acordo com os resultados apresentados, para os genótipos São José e IAC-862210, o tratamento que possibilitou a melhor porcentagem de sobrevivência dos meristemas introduzidos foi o cloreto de benzalcônio (Bz). Já para o genótipo Santa Isabel, o melhor tratamento foi com o agente hipoclorito de sódio (Cl) proporcionando maior pegamento das gemas. No caso do genótipo IAC-862480 pode ser visualizado que os agentes cloreto de benzalcônio e hipoclorito de sódio propiciaram bons índices de pegamento dos meristemas tratados com estes agentes. Por outro lado pode ser observado que o tratamento com cloreto de mercúrio (Hg), foi o de menor eficácia no que diz respeito a porcentagem de sobrevivência, com exceção do genótipo IAC-862210 que parece tolerar o tratamento com cloreto de mercúrio de maneira mais eficiente que outros genótipos.

Segundo Cathum et al. (2005) o mercúrio é um metal pesado considerado altamente tóxico tanto às plantas como aos animais podendo ser encontrado no solo, água e atmosfera. Por esse motivo o tratamento com mercúrio é ineficiente no que diz respeito a sobrevivência de gemas de cana-de-açúcar. De acordo com os resultados apresentados na Figura 1 fica evidente que o agente de desinfestação menos tóxico aos explantes de cana de açúcar, independente do genótipo é o cloreto de benzalcônio. No entanto, a eficiência do método de desinfestação deve levar em consideração além da toxidez do agente para o explante, também a eficiência de combate aos microrganismos responsáveis pela contaminação do meio de cultivo.

Os resultados apresentados na Figura 2 indicam que todos os agentes utilizados promoveram uma boa desinfestação dos explantes, com índices de contaminação máximos em torno de 50% para o agente cloreto de benzalcônio nos genótipos IAC. No entanto, assim como para sobrevivência dos explantes, percebe-se que os genótipos reagem diferencialmente em relação a descontaminação com cada agente desinfestante. Neste caso o genótipo Santa Isabel

foi o único em que o cloreto de benzalcônio apresentou elevada eficiência no combate aos microorganismos contaminantes.

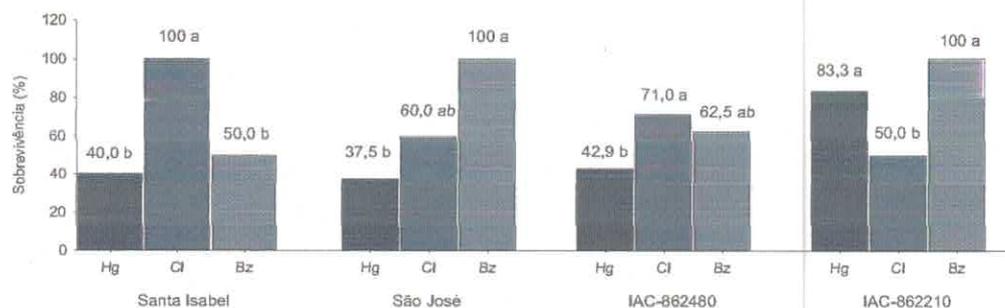


Figura 1 Teste de comparação de médias da porcentagem de sobrevivência em quatro genótipos de cana-de-açúcar submetidos a três agentes desinfestantes para cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra para cada genótipo não diferem estatisticamente entre si (Tukey $p \leq 5\%$).

No entanto pode ser verificado na Figura 2, que o tratamento com cloreto de mercúrio foi o mais eficiente como agente desinfestante, não apresentou contaminação nos genótipos São José, IAC-862480 e IAC-862210, mostrando ser um bom agente desinfestante de cana-de-açúcar. Apesar do cloreto de mercúrio ter apresentado um baixo nível de sobrevivência, o seu bom desempenho como desinfestante justifica a sua utilização, principalmente em genótipos com tolerância a este agente como o caso do genótipo IAC-862210.

Ainda na Figura 2, verifica-se que o cloreto de benzalcônio foi o tratamento de menor eficiência no que diz respeito a desinfestação de explantes de cana-de-açúcar, visto que em todos os genótipos exceto o Santa Isabel a porcentagem de contaminação foi elevada. O cloreto de benzalcônio, apesar de pouco tóxico aos vegetais, sua eficiência na desinfestação parece ser menor em relação aos outros produtos. Por fim nota-se que o tratamento com hipoclorito de sódio apresentou uma eficiência intermediária entre o cloreto de mercúrio e o cloreto de benzalcônio no controle das infestações.

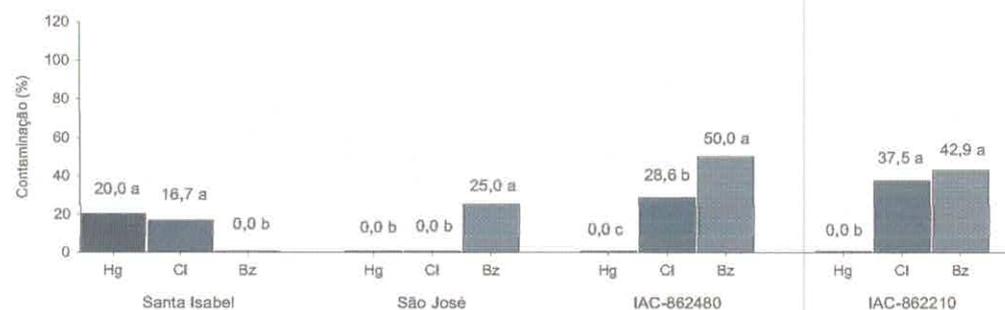


Figura 2 Teste de comparação de médias da porcentagem de contaminação em quatro genótipos de cana-de-açúcar submetidos a três agentes desinfestantes para cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra para cada genótipo não diferem estatisticamente entre si (Tukey $p \leq 5\%$).

Os resultados da análise conjunta dos quatro genótipos vs agentes desinfestantes em relação ao número de tubos oxidados, mostram que, o agente cloreto de mercúrio de alguma forma minimizou a oxidação dos tubos, que é provocada por compostos resultantes do metabolismo do tecido vegetal (dados não apresentados). Em contrapartida o hipoclorito de sódio foi o que acarretou o maior porcentagem de oxidações. Deve ser ressaltado que a oxidação é um

processo que não interfere no desenvolvimento do material vegetal e não contribui para o aparecimento de contaminações, no entanto dificulta a sua visualização caso esteja presente aumentando a probabilidade de propagação da contaminação durante as sucessivas gerações de cultivo *in vitro*.

Conclusão

A eficiência do agente desinfestante é dependente do genótipo de cana-de-açúcar que se pretende tratar.

O agente desinfestante cloreto de mercúrio, foi o que apresentou, para a maioria dos genótipos, a melhor eficiência na desinfestação de explantes de cana-de-açúcar, quando imersos por 30 minutos na concentração de 1%.

O melhor índice de sobrevivência encontrado para a maioria dos genótipos ocorreu quando desinfestados com cloreto de benzalcônio a 0,1% por 30 minutos.

Recomenda-se a utilização de cloreto de mercúrio 1% por 30 minutos para a desinfestação de explantes de cana-de-açúcar para cultivo *in vitro*.

Agradecimentos

Agradecemos a colaboração do Assistente Sebastião Evaristo pelo auxílio na condução dos trabalhos e a FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro.

Literatura Citada

- CATHUM, S.; VELICOGNA, D.; OBENAU, A. et al. Detoxification of Mercury In The Environment. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v.381, n.4, p.1491-1498, 2005.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPq, v.1, 1998. p.183-260.
- MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, v.36/37, p.5-10, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NUSSIO, L.G.; SANTOS, M.C.; QUEIROZ, O.C.M. Estratégias para produção de bovinos diante da expansão da cultura canavieira. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 24., 2007, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2007. p.243-272.
- SOUSA, G.C.; CLEMENTE, P.L.; ISAAC, V.L.R. et al. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.1, p.405-407, 2007.

2009
ZOOTEC

Realização:



UNICETEX
Centro de Inovação Tecnológica
e Extensão Universitária