



simpósio estadual de **AGROENERGIA**

IV reunião técnica de agroenergia - RS

MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Caren Regina Cavichioli Lamb¹, Fernando Fracaro², Cândida Raquel Scherrer Montero³, Cristiane Troian⁴, Mariane Richesi⁵, Sergio Delmar dos Anjos e Silva⁶, Alencar Paulo Rugeri⁷.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma cultura muito importante para o agronegócio brasileiro. Recomendações específicas de protocolos que descrevem a micropropagação de espécies em particular não são encontradas. A variabilidade na resposta morfo genética *in vitro* existente, não apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da mesma espécie, leva à necessidade de se definirem protocolos diferenciados. Vários manuais de cultura de tecidos (DE FOSSARD, 1976; EVANS et al., 1983; BONGA & DURZAN, 1987) e mais, especificamente, de micropropagação (KYTE, 1983) relatam protocolos para diversas espécies (TORRES et al., 1998). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi otimizar um protocolo de micropropagação de mudas de cana-de-açúcar livres de vírus.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados acessos de cana-de-açúcar coletados em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, dentre elas, Planalto Superior, Planalto Médio, Alto e Médio Vale do Uruguai, Campanha, Serra e Fronteira Oeste e a variedade RB 855156 proveniente da RIDESA – Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Primeiramente, os colmos de cana-de-açúcar foram coletados e levados até o Laboratório de Biotecnologia Vegetal – LBV, FEPAGRO Serra do Nordeste, em Caxias do Sul, lavados superficialmente, através da limpeza vigorosa com esponja e detergente líquido, a fim de remover a poeira e a fumagina existentes na

¹ Dra. em Fitotecnia / FEPAGRO. caren@fepagrors.gov.br.

² Dr. em Ecologia Recursos Naturais / FEPAGRO. ffracaro@yahoo.com.br.

³ Dra. em Fitotecnia / FEPAGRO. candida-montero@fepagrors.gov.br.

⁴ Graduanda em Agronomia/FEPAGRO. cristianetroian@gmail.com

⁵ Graduanda em Ciência Biológica/FEPAGRO. marianerichesi@gmail.com

⁶ Dr. em Fitotecnia / EMBRAPA CPACT. Sergio.anjos@cpact.embrapa.br.

⁷ Engenheiro Agrônomo / EMATER/RS-ASCAR. arugeri@emater.tche.br.

superfície dos toletes. Após, os toletes foram individualizados com o auxílio de uma faca previamente desinfestada pela imersão em álcool 70 % por 10 min. Sequencialmente, foram imersos em etanol (EtOH) 70% por 1 min, hipoclorito de sódio (NaOCl) 1 % por 40 min e água destilada autoclavada a 52°C por 30 min. Os toletes foram colocados em caixas contendo aproximadamente 30 L de substrato Carolina Soil autoclavado por 50 min e transferidos à estufa, por 20 dias para o início da brotação. Após a indução das radículas e dos primórdios folheares os toletes para o isolamento dos meristemas. A desinfestação dos brotos e a micropropagação seguiram a metodologia proposta por OLIVEIRA et al. (2000). Os toletes crescidos foram cortados com uma faca desinfestada por imersão em EtOH 70 % por 10 min e em seguida foram submetidos a uma lavagem com água destilada autoclavada, detergente neutro e esponja onde toda a sua parte superficial foi limpa até a retirada total de algum tipo de contaminação externa (RODRIGUES et al., 2011). Os brotos foram retirados dos toletes com o auxílio de uma faca desinfestada por imersão em EtOH 70 % por 10 min, cortando-se o local em um tamanho de aproximadamente de 3 cm x 4 cm. O isolamento dos meristemas foi realizado com o auxílio de um microscópio e submetidos ao cultivo *in vitro* em frascos de germinação contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 0,2 mgL⁻¹ de Cinetina e 0,2 mgL⁻¹ de Benzilaminopurina (BAP), conforme VIEIRA et al. (2009), além de utilização de antibióticos e fungicidas. Após vários subcultivos *in vitro* os brotos foram transferidos para meio MS suplementado com diferentes concentrações de Ácido Naftaleno Acético (ANA) e Ácido Indol Butírico (AIB), variando de 0 a 2 mgL⁻¹ (BEHERA et al., 2009). As variáveis avaliadas foram número e altura médios de brotos e número e comprimento médios de raízes. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o programa estatístico System Analyses Statistic (SAS, 2001) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os materiais genéticos avaliados, a variedade comercial RB 855156 foi a que apresentou maior número de brotos quando submetidos ao meio MS suplementado com 0,2 mgL⁻¹ de Cinetina e 0,2 mgL⁻¹ de BAP, conforme Tabela 1.

A indução de raízes foi avaliada somente com a variedade comercial RB 855156, por ser a mais responsiva *in vitro*. Foi verificada a interação entre as diferentes doses de fitorreguladores de crescimento utilizados para as variáveis número e altura médios de brotos e número e comprimento médios de raízes avaliadas. Houve diferença significativa para as variáveis: número médio de brotos (Tabela 2), altura média de brotos (Tabela 3), número de raízes (Tabela 4) e comprimento médios de raízes (Tabela 5).

TABELA 1. Resposta dos materiais genéticos utilizados para a micropropagação *in vitro*. Laboratório de Biotecnologia Vegetal, de cana-de-açúcar e número de plântulas obtidas, FEPAGRO Serra do Nordeste, Caxias do Sul, 2011 e 2012

Material genético	Número inicial de meristemas	Total de brotos
76 A	23	5
87 A	12	0
72 A	18	0
IAC	21	0
Caiana	15	0
70	12	5
3 B	10	2
1 B	12	37
19 B	16	24
18 B	13	3
2 B	24	23
21 B	9	27
20 B	17	13
10 B	12	4
8B	12	0
20 B	30	35
RB 855156	100	2000

TABELA 2. Número médio de brotos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes doses de AIB ANA, FEPAGRO Serra do Nordeste, Caxias do Sul, 2012

ANA (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)			
	0,0	0,5	1,0	2,0
0,0	3,2 ABCD*	3,8 A	1,6 CDE	1,3 DE
0,5	3,9 A	3,6 AB	3,5 ABC	1,3 DE
1,0	3,7 A	2,4 ABCDE	2,1 ABCDE	1,0 E
2,0	3,9 A	1,7 BCDE	3,2 ABCD	1,0 E

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

TABELA 3. Altura média de brotos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes doses de AIB e ANA, FEPAGRO Serra do Nordeste, Caxias do Sul, 2012

ANA (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)			
	0	0,5	1	2
0,0	4,3 ABCD*	3,6 BCDE	3,3 BCDE	3,7 BCDE
0,5	4,5 ABC	3,4 BCDE	4,0 BCDE	3,7 BCDE
1,0	5,9 A	2,5 E	3,0 CDE	4,0 BCDE
2,0	4,8 AB	2,8 DE	2,8 CDE	4,1 BCDE

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

TABELA 4. Número médio de raízes de cana-de-açúcar submetidas a diferentes doses de AIB e ANA, FEPAGRO Serra do Nordeste, Caxias do Sul, 2012

ANA (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)			
	0	0,5	1	2
0	5,3 C*	9,8 A	0 D	0 D
0,5	5,4 C	4,9 C	1,9 D	0 D
1	8,5 AB	1,4 D	0,2 D	0 D
2	5,9 BC	0,2 D	0 D	0 D

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

TABELA 5. Comprimento médio de raízes de cana-de-açúcar submetidas a diferentes doses de AIB e ANA, FEPAGRO Serra do Nordeste, Caxias do Sul, 2012

ANA (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)			
	0	0,5	1	2
0	1,3 B*	2,8 A	0 C	0 C
0,5	0,8 BC	0,95 B	0,6 B	0 C
1	1,2 B	0,5 BC	0,03 C	0 C
2	0,5 BC	0,04 C	0 C	0 C

* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

CONCLUSÕES

Foi possível obter plântulas *in vitro*; os acessos apresentaram variabilidade genética quanto ao número de brotos; houve interação entre as concentrações de fitorreguladores de crescimento e a concentração recomendada para enraizamento de brotos de cana-de-açúcar foi de 0,5 mg L⁻¹ de AIB.

REFERÊNCIAS

BEHERA, K.K.; SAHOO, S. Rapid *In Vitro* Micropropagation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) Through Callus Culture. **Nature and Science**, 2009.

BONGA, J.M. **Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions**. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D.J., Ed. **Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 249-271.

DE FOSSARD, R.A. **Tissue culture for plant propagators**. Armidale: University of New England, 1976.

EVANS, D.A., SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. 970 p.

KYTE, L. **Plantes from test tubes**. Portland: Timber Press, 1983. 132 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. (1962). Revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. S.; VILARINHOS, A. D. **Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca**. Pesquisa Agropecuária Brasileira 35: p. 2329-2334, 2000.

RODRIGUES, L.R.; TESSELE, C.; SOUZA, E.A.de; CAETANO, W. Ensaio Preliminares para a Clonagem *In Vitro* de Acessos de Cana-de-Açúcar Cultivados no Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Universidade Federal de Pelotas, v.17, p.1-6, 2011.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF. Embrapa Hortaliças, 1998.

VIEIRA, R.A.; SILVA, C.M.da.; SOUTO, E.R.; HATA, T.; MACHADO, M.F.P.S.; MARCUZ, F.S. Diferentes Concentrações de 6-Benzilaminopurina e Cinetina na Micropropagação *In Vitro* das Variedades RB 867515 e RB 855156 DE Cana-de-Açúcar. **Campo Digital, Campo Mourão**, v.4, n.1, p.122-126, 2009.