

## Micropropagação fotoautotrófica *in vitro* de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de sacarose.

Dias, André Luís de França<sup>1</sup>; Silva, Karime Soares da<sup>2</sup>; Rivas, Rebeca<sup>1</sup>; Alves, Gilberto Dias<sup>1</sup>; Houllou-Kido, Laureen Michelle<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade de Pernambuco (UPE) – Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Av. Agamenon Magalhães, s/n, Santo Amaro, Recife/PE, CEP 50.100-010, fone (81) 3416-4000, email: [andreluisfd@hotmail.com](mailto:andreluisfd@hotmail.com), [rebecarivas@gmail.com](mailto:rebecarivas@gmail.com), [alvesgd@icb.upe.br](mailto:alvesgd@icb.upe.br); <sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) - Departamento de Agronomia, Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife/PE, telefone: (81) 3320-6003, email: [karyagronomia@hotmail.com](mailto:karyagronomia@hotmail.com). <sup>3</sup>Pesquisadora da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Biologia Molecular, Av. Gal. San Martin, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife/PE, Caixa Postal: 1022, fone (81) 2122-7200, email: [laureenhk@yahoo.com](mailto:laureenhk@yahoo.com).

### INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar tem um alto valor econômico, devido à sacarose contida em seu caule. O Brasil é hoje o principal produtor de cana-de-açúcar do mundo e seus produtos são amplamente utilizados na produção de açúcar, álcool e mais recentemente, o biocombustível (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Cana-de-a%C3%A7%C3%BAcar>).

A micropropagação em cana-de-açúcar é muito empregada em associação aos programas de melhoramento genético. Neste caso, a clonagem *in vitro* permite a rápida multiplicação do material selecionado mantendo-se a fidelidade genética em relação ao explante inicial (Cidade, 2006). No cultivo convencional, existem dificuldades, como a necessidade de grandes áreas para o cultivo, dependência de fatores climáticos e grande risco de doenças (Erig, 2005). A viabilidade comercial desta metodologia está associada aos custos de produção (Altman, 1999). Existem vários fatores que estão correlacionados aos custos da micropropagação como: ocorrência de contaminação *in vitro*, difícil adaptação na aclimação *ex vitro*; mão-de-obra capacitada (Kurata & Kozai, 1992; Kozai & Kubota, 2001) e gastos financeiros para funcionamento e manutenção das salas de crescimento, onde apresenta iluminação e temperatura artificial controlada (Standaert de Metsenaere, 1991; Kodym & Zapatarías, 1999). Utilização da micropropagação fotoautotrófica associada à luz natural e a substituição de alguns componentes do meio de cultura como a sacarose, o ágar, fonte de nitrogênio, mostram alternativas para a redução de custos na micropropagação (Bernardi, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar em casa-de-vegetação, reduzindo a quantidade de sacarose necessária para o desenvolvimento das plantas.

### MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Biologia Molecular da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). Utilizou-se gemas axilares de cana-de-açúcar da cultivar RB932520, mantidas *in vitro*.

Em câmara de fluxo laminar, as gemas axilares foram inoculadas em 4 meios de cultura diferentes. A composição do meio de cultura comum a todos os tratamentos utilizados na propagação *in vitro* de propágulos de cana-de-açúcar foi os sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), inositol 0,1g.L<sup>-1</sup>, glicina 0,002g.L<sup>-1</sup>, BAP 0,2mg.L<sup>-1</sup>, KIN 0,1mg.L<sup>-1</sup>. Foram testadas diferentes concentrações de sacarose nos meios de cultura [0g.L<sup>-1</sup> (T1), 5g.L<sup>-1</sup> (T2), 10 g.L<sup>-1</sup> (T3) e 20 g.L<sup>-1</sup> (T4)]. O pH do meio foi de 5,8, ajustado antes da autoclavagem (15 minutos à 120 °C). Após a inoculação dos ápices caulinares nos meios de cultura, os frascos foram lacrados com papel de filtro. Em relação ao fator 1 (quantidade de sacarose no meio de cultura), o experimento apresentou um total de 12 frascos por tratamento com dois explantes

por frasco, totalizando 24 repetições/tratamento e 96 explantes. Em relação ao ambiente (fator 2), 24 frascos (6 frascos/tratamento) permaneceram na sala de crescimento (SC). Os outros 24 frascos foram mantidos na casa-de-vegetação (CV) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco. Os meios foram renovados a cada 15 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com avaliação semanal, observando os parâmetros: presença/ausência de brotação, número de brotos, morte do explante, presença/ausência de raiz. Nos parâmetros que apresentam presença/ausência foi atribuído valor 1 à presença e valor 0 à ausência. Os valores paramétricos foram transformados em dados que possibilitassem a análise estatística, através da fórmula  $\sqrt{X + 0,5}$ , onde X indica o valor paramétrico. Os dados foram submetidos à análise de variância, e por apresentar dois fatores (concentração de sacarose e ambiente de cultivo), utilizou-se um modelo estatístico duplo fatorial, complementadas pelo teste de médias de Tukey, realizada com o auxílio do programa ASSISTAT versão 7.4 beta (2006).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira análise (8 dias) tanto do fator 1 (quantidade de sacarose no meio de cultura) quanto do fator 2 (ambiente), não foi observada diferença entre os tratamentos, independente da característica analisada (tabela 1). No entanto, aos 15 dias, foi observado que apenas o fator 1 (quantidade de sacarose) interferiu em dois parâmetros analisados (Média de brotos e média de mortalidade). No entanto, a diferença observada ocorreu entre o meio desprovido de fonte de sacarose, em relação aos meios com sacarose (tabela 2). Não houve diferença entre os parâmetros analisados nos meios que foram suplementados com sacarose. Este resultado indica que a quantidade de sacarose utilizada não interfere no desenvolvimento *in vitro* de ápices caulinares de cana-de-açúcar. A penas a ausência da fonte de carbono interfere no desenvolvimento *in vitro*. O tratamento 3 (10 g.L<sup>-1</sup>) mantido na casa-de-vegetação apresentou a melhor média de brotação tanto do 8º quanto no 15º dia.

Apesar das porcentagens de brotação não terem apresentado diferenças estatísticas, foi observada uma brotação maior no tratamento 3 (10 g.L<sup>-1</sup>) no 8º dia e nos tratamentos 2 (5 g.L<sup>-1</sup>) e 3 (10 g.L<sup>-1</sup>) no 15º dia. Com relação ao ambiente (fator 2), os resultados indicam que a ausência de controle de temperatura ou de fotoperíodo não interferem no desenvolvimento *in vitro* de ápices caulinares de cana. Este resultado está de acordo com o que foi descrito anteriormente na literatura. Em Cuba a utilização da luz natural em “Bio-fábricas” foi um sucesso, utilizando as casas das vilas em laboratórios de cultura do tecido (Baezas-Lopez, 1995).

Tabela 1. Média de brotos, porcentagem de brotação, média de mortalidade e porcentagem de enraizamento referentes ao 8º dia de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar (cv. RB932520).

Fator	Tratamento	Média de brotos	Brotação(%)	Média de mortalidade	Enraizamento (%)
Sacarose	(1) 0 g.L <sup>-1</sup>	0,20	20,83	1,22	0
	(2) 5 g.L <sup>-1</sup>	0,66	41,66	1,22	0
	(3)10 g.L <sup>-1</sup>	0,79	45,83	1,22	0
	(4)20 g.L <sup>-1</sup>	0,37	25	1,22	0
Ambiente	SC	0,47	37,50	1,22	0
	CV	0,54	29,16	1,22	0

\* SC – Sala de crescimento, CV – Casa-de-vegetação.

Tabela 2. Média de brotos, porcentagem de brotação, média de mortalidade e porcentagem de enraizamento referentes ao 15º dia de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar (RB932520).

Fator	Tratamento	Média de brotos	Brotação(%)	Média de mortalidade	Enraizamento (%)
Sacarose	(1) 0 g.L <sup>-1</sup>	0,00 b <sup>1</sup>	0,00	0,70 b	0
	(2) 5 g.L <sup>-1</sup>	2,54 a	87,50	1,17 a	0
	(3) 10 g.L <sup>-1</sup>	3,54 a	87,50	1,22 a	0
	(4) 20 g.L <sup>-1</sup>	2,08 a	79,16	1,22 a	0
Ambiente	SC	1,87	56,25	1,06	0
	CV	2,20	70,83	1,09	0

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. \* SC – Sala de crescimento, CV – Casa-de-vegetação.

A média de mortalidade não diferiu estatisticamente no 8º dia, demonstrando a viabilidade de todos os tratamentos em ambos ambientes. No entanto, no 15º dia observou-se morte total dos explantes do tratamento 1 (0 g.L<sup>-1</sup>). Este resultado indica que ausência de sacarose inviabilizou o desenvolvimento *in vitro* independentemente do ambiente de cultivo. No entanto, plantas com cloroplastos funcionais podem crescer em meios de cultura sem sacarose, desde que o ambiente *in vitro* da micropropagação seja adaptado para permitir a fotossíntese (Kozai e Iwanami, 1988). A ausência de desenvolvimento radicular foi observada em ambos fatores, tanto no 8º quanto no 15º dia, ou seja, a sacarose não interfere no desenvolvimento do sistema radicular.

Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que a micropropagação fotoautotrófica pode reduzir as concentrações padrões de sacarose que são fornecidas no meio MS sem haver prejuízo para o desenvolvimento *in vitro* de cana-de-açúcar. Da mesma forma, este estudo indicou que o cultivo *in vitro* sem condições controladas de fotoperíodo e temperatura (casa-de-vegetação) é viável para a micropropagação de cana-de-açúcar.



Figura 1. Explantes de cana-de-açúcar (RB932520) propagadas *in vitro* na casa de vegetação, submetidas ao contato direto com o ambiente natural (não controlado).

## CONCLUSÃO

O uso da luz natural e o cultivo sem controle de temperatura e fotoperíodo têm efeito similar na micropropagação de cana-de-açúcar (RB932520) em sala de crescimento. A redução

da quantidade de sacarose não interfere no desenvolvimento dos ápices caulinares de cana independente se há ou não controle das condições de cultivo (fotoperíodo, temperatura).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN, A. Plant biotechnology in the 21<sup>st</sup> century: the challenges ahead. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v.2, n.2, p 51-55, 1999.

Baezas-Lopez, P. 1995. Cubans enlist the sun in virus-free propagation. *Ceres* 156: 15-16.

BERNARDI, W.F. et al. Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. **Rev. Bras. Frutic.**, Dez 2004, vol.26, no.3, p.503-506.

CIDADE, D.A.P. et al. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras.** vol.41 no.3 Brasília Mar. 2006.

ERIG, Alan Cristiano and SCHUCH, Márcia Wulff. Photoautotrophic micropropagation and use of the natural light. **Cienc. Rural**, July/Aug. 2005, vol.35, no.4, p.961-965. ISSN 0103-8478.

KODYM, A.; ZAPATARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv, 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.55, p.141-145, 1999.

KOZAI, T; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Reseach**, Tokjo, v.114, p.525-537, 2001.

KOZAI, T; IWANAMI, Y. Effects of CO<sub>2</sub> enrichments and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of carnation in tissue culture during the preparation stage. **J. Jap. Soc. Hort. Sci.** 57: 279-288, 1988.

KURATA, K.; KOZAI, T. (eds). **Transplant production systems**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1992. 299p.

MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n. 4, p.473-497, 1962.

Sugarcane, Wikipedia, The Free Encyclopedia 2007. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cana-de-a%C3%A7%C3%BAcar>. Acesso em 20 de maio de 2007.

STANDAERT DE METSENAERE, R.E.A. Economic considerations. In: DEBERGH, PC.; ZIMMERMAN, R.H. (eds). **Micropropagation**. Dordrecht : Kluwer Academie, 1991. p.131-140.

#### PALAVRAS-CHAVE

*Saccharum officinarum*, cultivo *in vitro*, fotoautotrofismo, baixo-custo, açúcar.