

MICROPROPAGAÇÃO DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR

Paulo Roberto FARIA¹; Sérgio Tadeu SIBOV¹; Diego José CALDAS²; Victor
Fernando Rodrigues da SILVA²

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas - PGMP

² Instituto de Ciências Biológicas – ICB

e-mail: paulorfaria@ibest.com.br

Palavras-chave: cultura de tecidos, melhoramento, propagação vegetativa

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma das culturas de maior importância econômica no Brasil, devido sua grande área plantada e seus produtos e subprodutos, como o açúcar e o álcool. Nos últimos anos observou-se uma acentuada tendência de alta nos mercados do açúcar e do álcool, devido à substituição gradativa do petróleo pelo álcool, à crescente conscientização da redução das reservas mundiais de petróleo e das mudanças climáticas causadas pelo efeito estufa (Cidade et al., 2006).

O Estado de Goiás prepara-se para aumentar sua participação no mercado sucroalcooleiro. O número de usinas em operação somam 28, 16 estão previstas para entrar em funcionamento até dezembro de 2010, duas com previsão para entrar em atividade em 2011 e 13 se encontram em fase de projeto (Seplan-GO, 2009). Em decorrência da posição de destaque que ocupa na economia mundial, programas de melhoramento da cultura da cana-de-açúcar estão buscando respostas a diversas demandas do setor produtor como: rápida multiplicação, maior resistência à seca, pragas e patógenos, tolerância a herbicidas e aumento do teor de sacarose. As pesquisas na área de melhoramento são necessárias uma vez que as variedades, depois de algum tempo de reprodução vegetativa entram em degenerescência, perdendo vigor, produtividade e aumentando a suscetibilidade às principais pragas e doenças (Kerbaui, 1997).

A propagação *in vitro*, ou micropropagação, é uma das técnicas empregadas na cultura de tecidos vegetais. De início, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de uma planta, desinfetados e cultivados assepticamente por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter uma nova planta idêntica à original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal. Para que variedades sejam micropropagadas eficientemente faz-se necessário, primeiramente, o estabelecimento de protocolos de desinfestação dos explantes, a elaboração de meios nutritivos específicos e demais condições ideais de cultivo *in vitro*. Ainda não há protocolos de micropropagação eficientes para as variedades de cana-de-açúcar que pertencem ao programa de melhoramento genético Ridesa/UFG. Dada a importância da cultura de cana-de-açúcar no Estado de Goiás e a expansão da área cultivada prevista para os próximos anos, este trabalho tem como objetivo principal estabelecer protocolos de micropropagação destas variedades, que se tornarão ferramentas úteis nos programas de melhoramento genético da cultura. A primeira etapa neste sentido é o estabelecimento de um eficiente método de desinfestação dos explantes de cana-de-açúcar, evitando-se a competição de fungos e bactérias pelos nutrientes do meio, a liberação de toxinas e a consequente morte do tecido vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás – UFG, em Goiânia, GO. Foram utilizados ápices caulinares (segmentos apicais de 40 cm) de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB 98710, proveniente do jardim clonal da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da UFG.

Desinfestação: Baseado no trabalho de Melo et al. (2010) foram elaborados cinco tratamentos para controlar a oxidação e desinfestação dos explantes. **T1:** os explantes imersos em casugamicina (4 mL L^{-1}) por 20 horas, detergente 1:1 por 10 minutos, hipoclorito de sódio comercial NaClO (1:1) por 15 minutos, casugamicina (4 mL L^{-1}) por 15 minutos, álcool 70% (v/v) por um minuto e 30 segundos, NaClO (1:1) por 20 minutos. **T2:** explantes imersos em detergente 1:1 por 15 minutos,

NaClO (1:1) por 20 minutos, casugamicina (4 mL L^{-1}) por três horas minutos, álcool 70% (v/v) por um minuto e trinta segundos, bicloreto de mercúrio HgCl_2 (0,1%), por 20 minutos, NaClO (1:1) por 20 minutos. **T3:** explantes imersos em casugamicina (4 mL L^{-1}) por 20 horas, detergente 1:1 por 10 minutos, (NaClO) 1:1 por 20 minutos, álcool 70% (v/v) por um minuto, HgCl_2 0,1%, por 20 minutos, (NaClO) 1:1 por 20 minutos. **T4:** explantes imersos em casugamicina (4 mL L^{-1}) por 9 horas, detergente 1:1 por 10 minutos, NaClO (1:1) por 15 minutos, casugamicina a 8 mL L^{-1} por 30 minutos, álcool 70% (v/v) por um minuto, HgCl_2 0,1%, por 20 minutos NaClO (1:1) por 10 minutos. **T5:** Na desinfestação os explantes foram imersos em casugamicina (1 mL L^{-1}) por 64 horas, NaClO (1:3) por 30 minutos, casugamicina (8 mL L^{-1}) por 50 minutos, álcool 70% (v/v) por um minuto, NaClO (1:2) por 5 minutos. Após inoculação o meio contendo explante inoculado recebeu um jato de casugamicina (8 mL L^{-1}). Entre todas as etapas dos tratamentos, os explantes receberam tríplice lavagem em água destilada estéril para remover os agentes desinfectantes e no momento da inoculação foram previamente mergulhados em solução de hipoclorito de sódio NaClO (1:9).

Inoculação: Os ápices, foram reduzidos a aproximadamente 40 mm x 3 mm e inoculados em frascos *baby food* devidamente etiquetados, contendo 30 ml de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 3% de sacarose e 6,5% de ágar, o pH foi ajustado para 5,75 e autoclavados a $123 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, sob pressão de $1,3 \pm 1 \text{ kgf.cm}^{-2}$, por vinte minutos. Foram inoculados cinco explantes e vedados com filme plástico polipropileno. Após a inoculação os tratamentos permaneceram em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e 20 repetições, o experimento foi avaliado 25 dias após a inoculação, as variáveis observadas foram: *i)* número de explantes oxidados *ii)* número de explantes contaminados com fungos; *iii)* número de explantes contaminados com bactérias. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle da oxidação foi eficiente em todos os tratamentos, isso se deve ao uso do bicloreto de mercúrio e também ao manuseio adequado dos explantes. Os tratamentos 01 e 05 também tiveram controle eficiente da oxidação mesmo não usando o bicloreto, isso é importante, pois evita o uso deste composto tóxico e de difícil descarte.

A análise de variância indicou que os tratamentos para descontaminação diferiram entre si. A contaminação fúngica foi muito baixa (Tabela 1), o maior problema foi a contaminação bacteriana (Tabela 2) considerando todos os tratamentos. Considerando fungos e bactérias, a menor porcentagem de contaminação foi verificada no tratamento T5 com média de contaminação de 42%. Todos os demais tratamentos apresentaram taxas de contaminação igual ou superior a 70% (Tabela 3). Porém, a menor taxa de contaminação obtida no tratamento T5 (42%) ainda é muito alta requerendo a utilização de outros procedimentos e/ou reagentes, como antibióticos, para um controle mais efetivo.

Tabela 1. Valores médios de explantes de cana-de-açúcar contaminados com fungos.

Tratamentos				
T2	T3	T5	T1	T4
0,19 a ¹	1,18 a	0,06 ab	0,02 b	0,00 b

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* no nível de 5%.

Tabela 2. Valores médios de explantes de cana-de-açúcar contaminados com bactérias.

Tratamentos				
T1	T2	T4	T3	T5
0,88 a ¹	0,78 a b	0,70 ab	0,56 bc	0,37 c

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* no nível de 5%.

Tabela 3. Valores médios de explantes de cana-de-açúcar contaminados com fungos e bactérias.

Tratamentos				
T2	T1	T3	T4	T5
0,89 a ¹	0,88 a	0,70 a	0,70 a	0,42 b

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* no nível de 5%.

CONCLUSÕES

- O tratamento no qual o uso da casugamicina por um período de tempo maior (tratamento T5) confere melhor resultado para a descontaminação de explantes de cana-de-açúcar. Porém, novos testes deverão ser realizados, associando os métodos acima com o uso de antibióticos no meio para melhor controle da contaminação bacteriana que foi muito alta.
- Técnicas de desbastes, evitando cortes no nível do nó, juntamente com o uso do Bicloreto de mercúrio, possibilitam a diminuição da porcentagem de oxidação no estabelecimento *in vitro* de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento do Estado de Goiás. **Avaliação da Safra Agrícola de Cana-de-açúcar.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1_cana_10.pdf>. Acesso 15 jun. 2010.

INFOENER. Sistema de informações energéticas. **Cana-de-açúcar no Brasil.** Disponível em: <http://infoener.iee.usp.br/scripts/biomassa/br_cana.asp>. Acesso 15 jun. 2010.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.** Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, maio 1997.

MELO, E.F., MELO C.G, RODRIGUES, CR, VIEIRA, M.S. RAMOS, R.S, LOUREIRO, M.E., BARBOSA, M.H.P. Optimization of disinfection and establishment of *in vitro* explants of sugarcane (*Saccharum spp.*) in: **2nd Pan American congress on Plants and BioEnergy, São Pedro. Resumos, 2010.** p. 50-51.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 15, p. 473-497, 1962.

SEPLAN. Secretaria de Planejamento do Estado de Goiás, Gerência de Estatística Socioeconômica – 2009. Disponível em: <<http://www.seplan.go.gov.br>>. Acesso 10 jun. 2010.

Instituição de Fomento:

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.