

128

Circular Técnica

Pelotas, RS
Dezembro, 2011

Autores

Leonardo Ferreira Dutra

Eng. Agrônomo, Dr., D.Sc. em Agronomia,
pesquisador da Embrapa Clima Temperado,
Pelotas, RS,
leonardo.dutra@cpact.embrapa.br

Lorena Pastorini Donini

Bióloga, Dra., D.Sc. em Agronomia,
bolsista DTI-1/CNPq
Embrapa Clima Temperado,
Pelotas, RS,
lorenadonini@yahoo.com.br

Sérgio Delmar dos Anjos e Silva

Eng. Agrônomo, Dr., D.Sc. em Fitotecnia,
pesquisador da Embrapa Clima Temperado,
Pelotas, RS,
sergio.anjos@cpact.embrapa.br

Natália Dias Gomes da Silva

Bióloga, mestranda em Fisiologia Vegetal,
Embrapa Clima Temperado/UFPel,
Pelotas, RS,
nataliadiasgomes@hotmail.com

Fernanda Beatriz Thiel

Graduada em Ciências
Biológicas, Bolsista de Iniciação Científica da
Embrapa Clima Temperado/UFPel,
Pelotas, RS,
fernandathiel@yahoo.com.br

Josiane Mendonça Vitoria

Graduada em Tecnologia em Gestão Ambiental,
Bolsista de Iniciação Científica da
FAPERGS,
Pelotas, RS,
josiane_mendonca@hotmail.com

Fernanda Medeiros Zacarias

Graduada em Tecnologia em Gestão Ambiental,
Bolsista de Iniciação Científica da
FAPERGS,
Pelotas, RS,
fernanda_zacarias@hotmail.com

Protocolo de Micropropagação de Cana-de-açúcar

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tem grande importância econômica na agricultura no Brasil e, mais recentemente, com a utilização do etanol em escala mundial, torna-se ainda mais relevante. A propagação convencional desta espécie é realizada a partir de segmentos de colmos provenientes de plantas do campo, após o primeiro ou segundo ano de plantio. Porém, novas variedades estão continuamente sendo desenvolvidas e sua disponibilização pode ser acelerada por meio da biotecnologia, via micropropagação (Oliveira et al., 2010).

Para a cultura da cana-de-açúcar, o explante inicial a ser micropropagado é o meristema apical, que depois de isolado e inoculado em meio de cultura apropriado se desenvolve dando origem às plântulas que serão então multiplicadas, enraizadas e aclimatizadas.

A técnica de propagação desta espécie por meio de meristema apical é considerada uma alternativa vantajosa para a multiplicação de diversas variedades, devido à economia de tempo em relação às técnicas convencionais, além da obtenção de mudas de excelente qualidade fitossanitária e geneticamente idênticas ao material de origem (Vieira et al., 2009). Devido à necessidade da produção de mudas de cana-de-açúcar de alta qualidade fitossanitária, este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação aplicável à cultivar RB855156.

No presente trabalho foi estabelecido um protocolo completo de micropropagação de cana-de-açúcar, desde o estabelecimento até a aclimatização com produção de mudas prontas para o plantio no campo.

De plantas-mãe, localizadas no campo, na Embrapa Clima Temperado, foram coletados colmos (Figura 1A) e destes foram retirados os palmitos com aproximadamente 5 cm de comprimento (Figura 1B), os quais foram submetidos à desinfestação com imersão em álcool 70% por 2 minutos, em hipoclorito de sódio (2%) por 15 minutos, e realizada tríplice lavagem com água destilada autoclavada. Posteriormente, o meristema (Figura 1C) foi excisado com pinças e bisturi enquanto imerso em solução de ácido cítrico a 1,5%, para evitar sua oxidação.

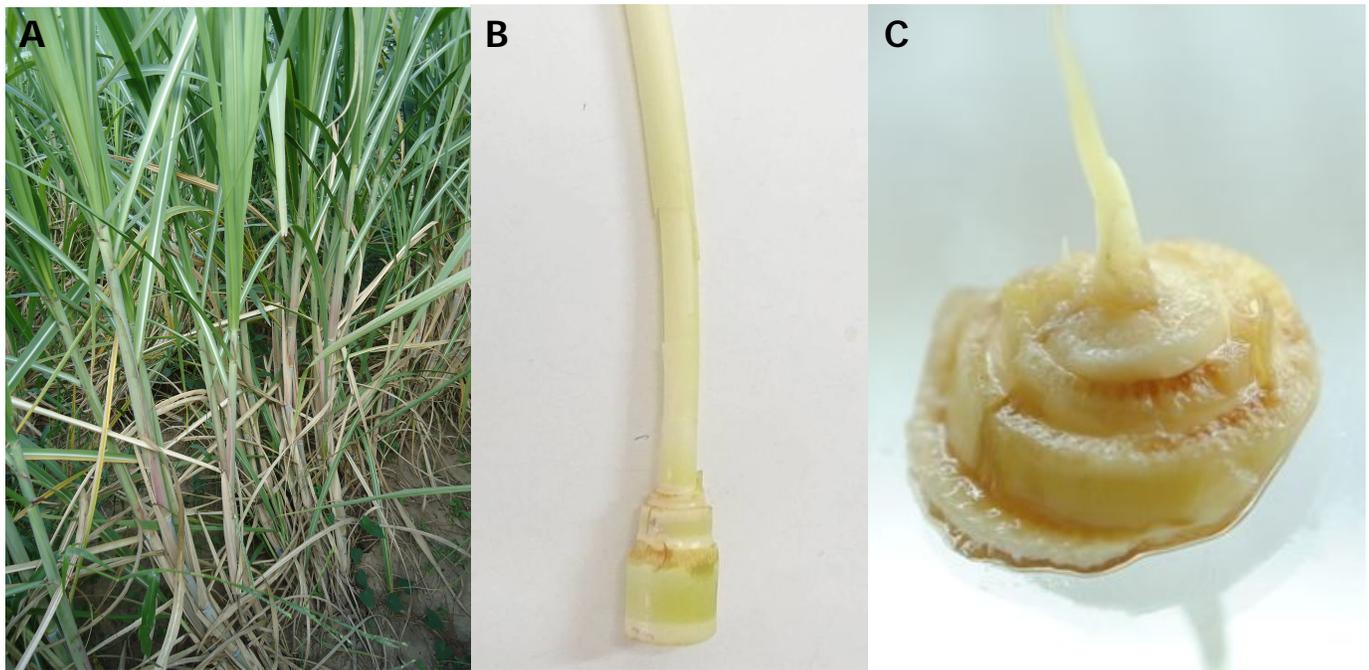


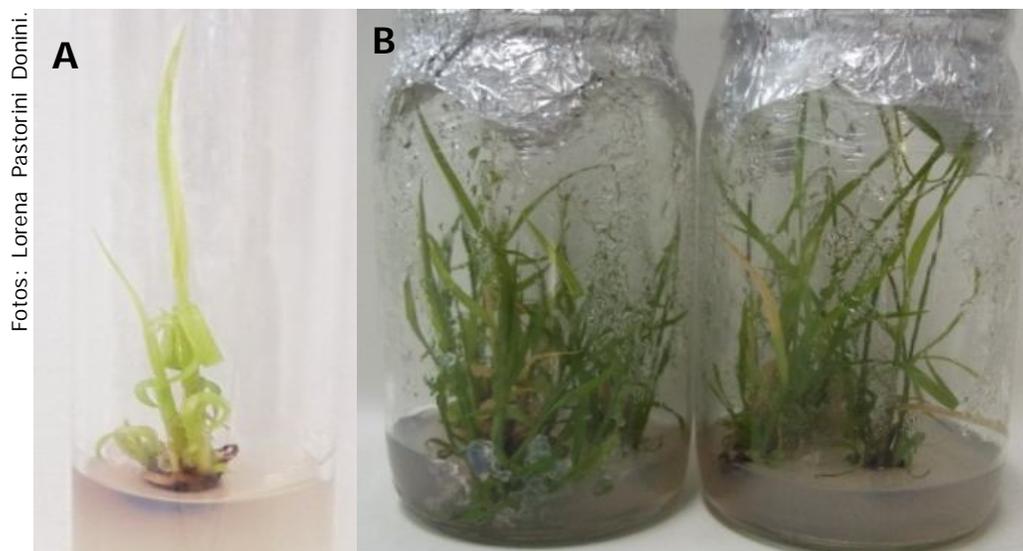
Foto: Lorena Pastorini Donini.

Foto: Paulo Luiz Lanzetta Aguiar

Figura 1: Colmos das plantas doadoras (A), palmito (B) e meristema (C) de cana-de-açúcar, cultivar RB855156.

Depois de desinfestados, os explantes foram inoculados em frascos contendo sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina (Lee, 1987), mantidos no escuro por cinco dias e posteriormente sob $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo

de fótons de $27 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Aos dez dias, os explantes foram trocados de meio de cultivo devido à oxidação fenólica, permanecendo por mais 15 dias até o desenvolvimento do explante, quando foi feita a primeira repicagem (Figura 2).



Fotos: Lorena Pastorini Donini.

Figura 2: Aspecto das plantas de cana-de-açúcar, cultivar RB855156 na primeira repicagem (A) e durante a multiplicação (B).

Visando multiplicar e quantificar a taxa de multiplicação dos explantes, foram realizadas seis repicagens, em média a cada 30 dias.

Durante as repicagens foi realizada a contagem do número de brotações que cada

explante inoculado emitiu, obtendo-se a taxa de multiplicação e o número de mudas micropropagadas após cada repicagem (Tabela 1).

Tabela 1: Taxa de multiplicação e número de plantas estimadas de cana-de-açúcar, cultivar RB855156, após seis repicagens no período de 180 dias. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2011.

Repicagem	Dias	Taxa de multiplicação	Número de explantes obtidos
1 ^a	25	5,00	5
2 ^a	55	5,40	27
3 ^a	80	7,15	193
4 ^a	120	6,98	1271
5 ^a	150	8,08	10.277*
6 ^a	180	6,76	69.473*

* Valores estimados.

Paralelamente às repicagens, foi realizado experimento de multiplicação, onde avaliou-se a modificação de meios tradicionalmente utilizados para cana-de-açúcar, visando a adaptação desta cultivar. Foram utilizadas brotações obtidas da multiplicação in vitro, com aproximadamente 4-6 cm, inoculadas em frascos contendo 30 mL de meio de cultura, que foram modificados a partir dos meios de Lee (1987) (combinações de concentrações de BAP e de cinetina que variaram de 0,1 a 0,2 mg L⁻¹) e Sood et al. (2006) (combinações de concentrações de AIA, BAP e cinetina que variaram de 0,1 a 0,2 mg L⁻¹). Foi observado que, mesmo não havendo diferenças entre os

tratamentos testados, houve sucesso na multiplicação in vitro.

Para o enraizamento in vitro, foram utilizadas brotações obtidas da multiplicação in vitro, com aproximadamente 4-6 cm, inoculadas em frascos contendo 30 mL de meio de cultura MS com diferentes auxinas (AIA e AIB) em diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹). A média de explantes enraizados foi de 93,26%, não havendo diferença entre os tratamentos, sendo observado que, mesmo sem a presença de auxinas, houve um satisfatório enraizamento dos explantes (Figura 3).

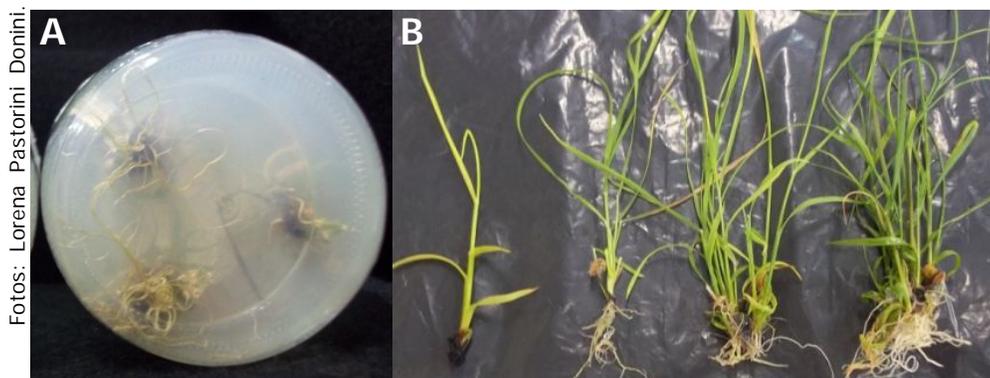


Figura 3: Enraizamento in vitro (A) e aparência das raízes de cana-de-açúcar (B), cultivar RB855156.

Após o enraizamento *in vitro*, as plantas foram retiradas dos frascos, tiveram suas raízes lavadas para retirada do excesso de meio de cultura e foram plantadas em copos plásticos de 150 mL, contendo cerca de 150 gramas dos substratos vermiculita, Plantmax® e mistura de vermiculita com

Plantmax® (1:1). Os copos com as plantas foram colocados em bandejas plásticas contendo uma lâmina de água no fundo e cobertos com plástico para manutenção da umidade nos primeiros 14 dias após a retirada do ambiente *in vitro* (Figura 4).



Figura 4: Aclimatização de cana-de-açúcar, cultivar RB855156, em diferentes substratos.

Aos 7, 14 e 21 dias foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas nos diferentes tipos de substratos. A partir dos 14 dias, a cobertura plástica ficou aberta por aproximadamente 8 horas por dia. Pôde-se observar que todas as plantas aclimatizadas sobreviveram, o que culminou com o final do processo de micropropagação para a cultivar RB855156.

Aos 30 dias após a aclimatização, o material foi retirado da cobertura e mantido em casa de vegetação por mais 15 dias até obtenção de tamanho maior. Aos 45 dias após a aclimatização houve a transferência das plantas para recipientes maiores (3 kg), contendo mistura de substrato e vermicomposto (1:1), mantidos em casa de vegetação por mais 60 dias até obtenção de tamanho adequado para o plantio no campo (Figura 5).

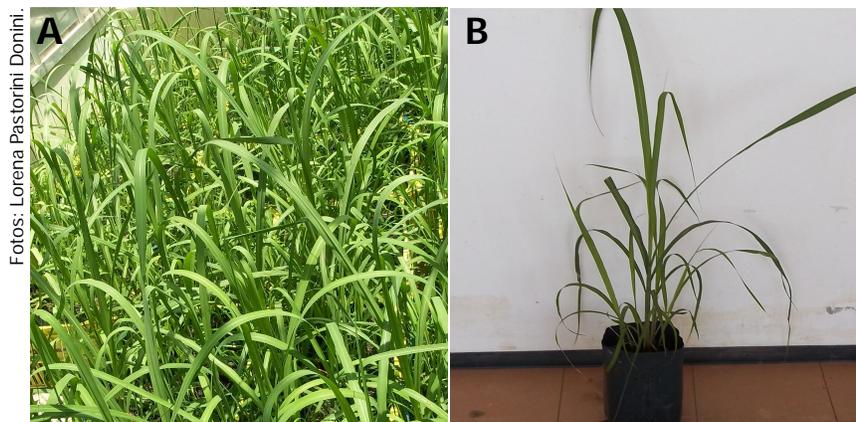


Figura 5: Mudanças de cana-de-açúcar (A), cultivar RB855156, obtidas a partir de micropropagação e muda pronta para o plantio no campo (B).

Referências

LEE, T. S. G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.10, p. 47-55, 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen , v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, A. L. B.; FERREIRA, L. T.; HERCULANO, L.; OLIVEIRA, R. A.; PEREIRA, J. A. F.; CAMARA, T. R. Ação do hipoclorito na assepsia de explantes de cana-de-açúcar para embriogênese somática. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE ,10 ., 2010, Recife. **Anais...** Recife: Editora da UFRPE, 2010. JEPEX. R0720-1.

SOOD, N.; GUPTA, P. K.; SIRIVASTAVA, R. K.; GOSAL, S. S. Comparative studies performance of micropropagated and conventionally propagated sugarcane plants. **Plant Tissue Culture & Biotech**, Blangadesh, v. 16, n. 1, p. 25-29, 2006.

VIEIRA, R. A.; SILVA, C. M.; SOUTO, E. R.; HATA, F. T.; MACHADO, M. F. P. S.; MARCUZ, F. S. Diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina e cinetina na micropropagação in vitro de variedades RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 122-126, 2009.

Circular

Técnica, 128

*Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento*

**GOVERNO
FEDERAL**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392, Km 78, Caixa Postal 403
Pelotas, RS - CEP 96010-971

Fone: (0xx53)3275-8100

Fax: (0xx53) 3275-8221

E-mail: www.cpact.embrapa.br
sac@cpact.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2011) 30 cópias

**Comitê de
publicações**

Presidente: Ariano Martins de Magalhães
Júnior

Secretária- Executiva: Joseane Mary Lopes
Garcia

Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid
Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suita de
Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane
Rodrigues Congro Bertoldi, Regina das Graças
Vasconcelos dos Santos, Isabel Helena Verneti
Azambuja, Beatriz Marti Emygdio.

Expediente

Supervisor editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlé

Revisão de texto: Bárbara Chevallier Cosenza

Editoração eletrônica: Juliane Nachtigall (estagiária)