

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MARIANA ALMEIDA FRANCA**

**MICROPROPAGAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVAR RB966928**

**CURITIBA**

**2016**

**MARIANA ALMEIDA FRANCA**

**MICROPROPAGAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVAR RB966928**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho  
Co-orientadora: Prof. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara

**CURITIBA**

**2016**

F814 Franca, Mariana Almeida  
Micropropagação de cana-de-açúcar cultivar RB966928. Mariana Almeida Franca. Curitiba: 2016.  
64 f. il.

Orientador: João Carlos Bepalhok Filho  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia – Produção Vegetal.

1. Cana-de-açúcar – Propagação in vitro. 2. Plantas –  
Propagação in vitro. I. Bepalhok Filho, João Carlos. II. Universidade  
Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. III. Título.

CDU 633.61:631.532



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



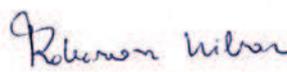
## PARECER

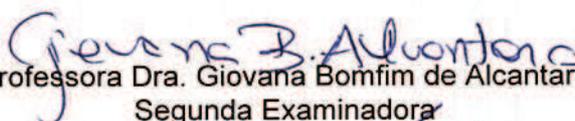
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **MARIANA ALMEIDA FRANCA**, sob o título "**MICROPROPAGAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVAR RB 966928**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

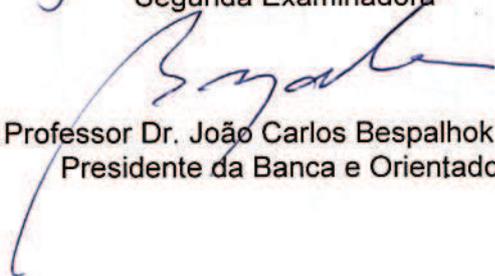
Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 23 de Fevereiro de 2016.

  
Professor Dr. Cícero Deschamps  
Coordenador do Programa

  
Professor Dr. Roberson Dibax  
Primeiro Examinador

  
Professora Dra. Giovana Bomfim de Alcantara  
Segunda Examinadora

  
Professor Dr. João Carlos Besspalhok Filho  
Presidente da Banca e Orientador

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria Saleth (*in memoriam*), que com todo amor pela vida, garra e perseverança me ensinou a correr atrás do que acredito, a seguir sempre em frente e a não ter medo dos obstáculos.

## AGRADECIMENTOS

E ao final desta jornada a única coisa que tenho a fazer é agradecer. Agradecer a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, me ajudaram a tornar este sonho realidade. Alguns nomes irei citar, mas tenho a certeza que são poucos diante dos dois anos de trabalho.

Quero agradecer ao meu orientador, o professor João Carlos Bessalho Filho, que me recebeu tão bem nesta universidade, desde o primeiro dia que aqui pisei para fazer estágio. Por toda a calma e paciência em me orientar, pelas palavras de apoio quando o desespero e o medo de não conseguir terminar o trabalho batiam à porta e por toda confiança em mim depositada.

À professora Giovana Bomfim de Alcantara, minha co-orientadora, que sempre esteve presente durante o mestrado me mostrando os primeiros passos a seguir no isolamento de meristemas, tarefa nada fácil! Também agradeço pela paciência em sanar todas as minhas dúvidas, ajuda no planejamento dos experimentos, pelas palavras de apoio e por acreditar no trabalho e no meu potencial.

À Universidade Federal do Paraná que me recebeu de portas abertas, me fornecendo toda a estrutura necessária para realizar esta pesquisa. Juntamente com a RIDESA, que me forneceu o material vegetal, a FUNPAR responsável pela compra de materiais. Ao Laboratório de Micropropagação de Plantas da UFPR na pessoa do técnico Carlos Maduro, ao programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal na pessoa da Lucimara que sempre esteve à disposição dos alunos e a CAPES que me cedeu à bolsa durante os dois anos de estudos.

Aos colegas do laboratório (João, Gabi, Felipe, Jéssica, Cassi, Laudi, Thaís, Gi, Tales, Rê e Ângelo) que dia-a-dia acompanhavam a rotina de trabalho e deixavam tudo mais leve com muitas risadas, conversas e ajuda. À Cissa que me recebeu muito bem, desde quando estive na faculdade para fazer estágio, me ensinando os primeiros passos no laboratório.

Às meninas da limpeza (Val e Irene), que com o bom humor e conversas alegravam nossos dias, além de deixarem o laboratório sempre limpo.

Agradeço aos amigos que fiz aqui e me ajudaram muito a me apaixonar por esta cidade. À Mari, a primeira pessoa que conheci na universidade, que com todo amor me emprestou a sua família, e compartilhou de tantos momentos de estudos, histórias, momentos, vinhos e chopes, risadas e muito amor! E que me apresentou outros amigos como a Rose que durante os dois anos do mestrado dividiu apartamento, histórias, conversas, alegrias e tristezas comigo.

Ao Tim (vulgo Elci) que há quase dois anos trouxe tantas cores para minha vida! Agradeço a todo carinho e amor, aos dias de lavagem de vidrarias, ajuda nas fotos do

trabalho, por todo o apoio que deu nos dias de fraqueza, por toda a paciência nos períodos de estresse do mestrado e pelo respeito pelo meu trabalho.

Agradeço à minha Tia Guinha que me deu a oportunidade de morar em Curitiba. À minha prima Kaká que me trouxe para esta cidade, por todo o apoio e entusiasmo para que eu realizasse este sonho, por todos os momentos bons e ruins que sempre dividimos. Obrigada, também, por me emprestar os seus amigos, como a Vanessa que se tornou uma grande amiga!

Agradeço aos meus pais Saleth e Fernando que são a base da minha vida, por todo amor e carinho, pelos ensinamentos que me passaram e por todos os esforços que sempre fizeram para que eu e meu irmão pudéssemos ter acesso à educação. Sei que, onde quer que estejam, também estão felizes por esta vitória e esta vitória é de vocês! Ao meu irmão que sempre me apoiou nas minhas decisões, dando incentivo e segurando as pontas para eu alcançar os meus sonhos.

E à Deus que abriu os caminhos para eu chegar até aqui, que ouviu as minhas preces, que sempre me iluminou e cuidou tão bem da minha vida!

A todos que de alguma forma me ajudaram, o meu muito obrigada!

“Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver.”

Amyr Klink

## RESUMO

A cana-de-açúcar foi trazida para o Brasil para quebrar o monopólio de produção de açúcar do Oriente Médio e, desde então, passou a ser uma cultura de grande importância econômica para o país. Atualmente o Brasil é o maior produtor de cana e de açúcar do mundo. Isto é devido ao somatório de variáveis favoráveis como: o clima adequado para a produção, o desenvolvimento de cultivares elite e o manejo da cultura. O desenvolvimento de cultivares de excelência é um ponto chave na produção. A cultivar RB966928 foi desenvolvida pela RIDESA e lançada no mercado em 2010. Ela possui boa brotação em cana planta e cana soca, resistência às principais doenças e excelente adaptabilidade fenotípica. O censo varietal realizado pela RIDESA em 2015 mostrou que a cultivar RB966928 foi a mais plantada nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Aliado ao uso de boas cultivares está o uso de mudas de qualidade, que ajudam a reduzir perdas, uniformizam a plantação e elevam a fitossanidade. Neste contexto a micropropagação tem um importante papel na produção de mudas, já que é possível produzir mudas de excelência em espaço e tempo reduzidos, além de garantir um alto grau de fitossanitarismo. Desta forma é importante desenvolver e otimizar protocolos de micropropagação para a produção massal de mudas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação para a cultivar de cana-de-açúcar RB966928. Para a brotação de meristemas foram testados dois tratamentos: meio de cultura MS com 0 mg L<sup>-1</sup> de cinetina e 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e meio de cultura MS com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Para a multiplicação avaliou-se as concentrações de 0; 0,2; 0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP em meio MS. Para a multiplicação em biorreator de imersão temporária avaliou-se as frequências de imersão de 1 vez ao dia, 4 vezes ao dia e 8 vezes ao dia e os tempos de imersão de 5, 10 e 25 minutos. Para o enraizamento utilizou-se os meios de cultura MS, MS com redução dos sais pela metade, MS com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB e MS com 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para a aclimatização variou-se a presença e ausência de uma cobertura com saco plástico para o crescimento das plantas e os locais de acondicionamento: sala de crescimento e casa de vegetação. Foi testado, também, a influência de concentrações de sacarose no enraizamento da cultivar RB966928 *in vitro*. Foram realizados cinco tratamentos com as seguintes concentrações de sacarose 0; 20; 40; 60 e 80 g L<sup>-1</sup>. A maior porcentagem de meristemas brotados foi obtida utilizando meio de cultura suplementado com citocininas. As concentrações crescentes de BAP elevaram as taxas de brotações adventícias, porém as concentrações mais altas reduziram o crescimento da parte aérea, assim a melhor dosagem para multiplicação da cultivar foi a de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. No biorreator a melhor frequência de imersão foi de 4 vezes ao dia e o tempo de 5 minutos de imersão. Para o enraizamento as plantas suplementadas com 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram maior crescimento de raízes e na aclimatização as plantas podem ser mantidas sem a cobertura do saco plástico e em casa de vegetação sem grandes prejuízos. O aumento crescente nas concentrações de sacarose elevou o comprimento da parte aérea, raízes, número de raízes, peso seco e fresco. A concentração de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose foi a que apresentou os melhores resultados. Desta forma foi possível desenvolver um protocolo de micropropagação para a cultivar de cana-de-açúcar RB966928.

**Palavras-chave:** *Saccharum* spp., biorreator de imersão temporária, meristema, sacarose.

## ABSTRACT

The sugarcane was brought to Brazil to break the sugar production monopoly in the Middle East and since then the sugarcane has become a very important crop for the economic in the country. Currently Brazil is the largest producer of sugarcane and sugar in the world. This is due to the sum of favorable variables such as climate for the production, development of elite cultivars and crop management. The development of excellent cultivars is a key point for producing. The cultivar RB966928 was developed by RIDESA released on the market in 2010. It has good plant cane and ratoon cane sprouting, resistance to major diseases and great phenotypic adaptability. The varietal census conducted by RIDESA in 2015 showed that RB966928 was the most planted cultivar in the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul. Coupled with the use of good cultivars is the use of quality seedlings, which assist to reduce losses, standardize planting and increase plant health. In this context micropropagation has an important role in the production of seedlings since it is possible to produce seedlings of excellence on reduced space and time in addition to ensuring a high level of plant health. Thus it is important to optimize micropropagation protocols for mass production of seedlings. The objective of this study was to develop a micropropagation protocol for sugarcane cultivar RB966928. For regeneration meristems two treatments were tested: culture media MS with 0 mg L<sup>-1</sup> kinetin and 0 mg L<sup>-1</sup> BAP and culture media MS with 0.1 mg L<sup>-1</sup> kinetin and 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP. For multiplication were tested concentrations of 0, 0.2, 0.5 e 1 mg L<sup>-1</sup> BAP in culture media MS. For multiplication in temporary immersion bioreactor the following aspects were evaluated: the immersion of 1 time a day, 4 times a day or 8 times a day and dipping frequency of 5, 10 and 25 minutes. For rooting it was compared the MS culture media, MS with salts reducing by half, MS with 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB and MS with 70 g L<sup>-1</sup> sucrose. For acclimatization it was varied the presence and absence of a plastic cover for the growth of plants and acclimatization site: growth chamber and greenhouse. It was tested also the influence of sucrose concentration in growth of RB966928 *in vitro*. Five treatments were performed with the sucrose levels of 0, 20, 40, 60 and 80 g L<sup>-1</sup>. The highest percentage of regenerated meristems was obtained using culture media supplemented with cytokinins. Increasing doses of BAP raise the adventitious shoots rates, however the higher concentrations reduced the shoot increase, thus the better dosage for multiplication of cultivar was 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP. In bioreactor the best immersion frequency was 4 times a day and immersion time of 5 minutes. For rooting plants supplemented with 70 g L<sup>-1</sup> sucrose showed greater growth of root and acclimatization plants can keep without plastic cover and in greenhouse with no major losses. The increase in sucrose doses increased the length of shoots, roots, number of roots, dry and fresh weight.. The level of 60 g L<sup>-1</sup> sucrose showed the best results. Therefore was possible develop a micropropagation protocol for sugarcane cultivar RB966928.

**Keywords:** *Saccharum* spp, temporary immersion bioreactor, meristem, sucrose.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....                                                                                 | 13 |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                                                                            | 15 |
| 2.1 CANA-DE-AÇÚCAR .....                                                                                        | 15 |
| 2.2 MICROPROPAGAÇÃO .....                                                                                       | 17 |
| 2.2.1 Micropropagação em cana-de-açúcar .....                                                                   | 18 |
| 2.2.2 Influência da sacarose na micropropagação .....                                                           | 20 |
| 2.3 MULTIPLICAÇÃO EM BIORREADORES .....                                                                         | 22 |
| 2.4 REFERÊNCIAS .....                                                                                           | 24 |
| <b>3 CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DA CULTIVAR RB966928 DE CANA-DE-AÇÚCAR.</b> 31 |    |
| RESUMO .....                                                                                                    | 31 |
| ABSTRACT .....                                                                                                  | 32 |
| 3.1 INTRODUÇÃO .....                                                                                            | 33 |
| 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                   | 34 |
| 3.2.1 Local de realização, origem do material e assepsia .....                                                  | 34 |
| 3.2.2 Meio de cultura para indução de brotação dos meristemas .....                                             | 34 |
| 3.2.3 Multiplicação das brotações .....                                                                         | 35 |
| 3.2.4 Multiplicação em Biorreator .....                                                                         | 36 |
| 3.2.5 Enraizamento das plântulas .....                                                                          | 37 |
| 3.2.6 Aclimatização das plantas .....                                                                           | 37 |
| 3.2.7 Análise estatística .....                                                                                 | 38 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                | 38 |
| 3.3.1 Meio de cultura para indução de brotação dos meristemas .....                                             | 39 |
| 3.3.2 Multiplicação das brotações .....                                                                         | 41 |
| 3.3.3 Multiplicação em Biorreator .....                                                                         | 44 |
| 3.3.4 Enraizamento .....                                                                                        | 46 |
| 3.3.5 Aclimatização .....                                                                                       | 49 |
| 3.4 CONCLUSÃO .....                                                                                             | 51 |
| 3.5 REFERÊNCIAS .....                                                                                           | 51 |
| <b>4. CAPÍTULO II: CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO CULTIVO IN VITRO DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVAR RB966928</b> .....  | 54 |
| RESUMO .....                                                                                                    | 54 |
| ABSTRACT .....                                                                                                  | 55 |
| 4.1 INTRODUÇÃO .....                                                                                            | 56 |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                    | 57 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                | 58 |
| 4.4 CONCLUSÃO .....                                                                                             | 62 |
| 4.5 REFERÊNCIAS .....                                                                                           | 62 |
| <b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....                                                                             | 64 |

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

- Figura 1. Explante inicial de cana-de-açúcar, cultivar RB966928 utilizado nos experimentos de multiplicação, multiplicação em biorreator e enraizamento. Barra: 1 cm..... 35
- Figura 2. Modelo do Biorreator de Imersão Temporária patenteado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utilizado nos experimentos de multiplicação em biorreator..... 36
- Figura 3. Copos plásticos, contendo uma planta de cana-de-açúcar, cultivar RB966928, com substrato plantmax<sup>®</sup> cobertos com sacos plásticos cortados nas pontas superiores, modelo utilizado nos tratamentos 1 e 2 da aclimatização. Barra: 1 cm..... 38
- Figura 4. Porcentagem de brotações dos meristemas em função do meio de cultura utilizado para a cultivar de cana-de-açúcar RB966928 após 21 dias de cultivo. Teste qui-quadrado significância  $\chi^2=9,89^{**}$ ..... 39
- Figura 5. Fases da brotação de meristemas da cultivar RB966928 de cana-de-açúcar. Início da regeneração (A), meristemas oxidados (B) e (C), meristema regenerado (D). Meio de cultura MS acrescido de 0,1 de CIN e 0,2 de BAP. Barra: 1 mm..... 40
- Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de BAP na multiplicação de brotações de cana-de-açúcar cultivar RB966928. A) Comprimento médio das brotações (cm), B) número médio de raízes, C) brotações por explante..... 42
- Figura 7. Fase de multiplicação das brotações da cultivar RB966928 de cana-de-açúcar. A) Testemunha (sem adição de reguladores), B) 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de CIN, C) 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de CIN, D) 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de CIN. Tempo de cultivo: 15 dias. Barra: 1 cm..... 43
- Figura 8. Comprimento da maior raiz em função dos meios de cultura para enraizamento de cana-de-açúcar cultivar RB966928 com 21 dias de cultivo. Tratamento 1: Testemunha (meio MS); Tratamento 2: MS/2 com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; Tratamento 3: 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB; Tratamento 4: 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose..... 46

Figura 9. Peso fresco e seco das raízes em função dos meios de cultura para enraizamento de cana-de-açúcar cultivar RB966928 com 21 dias de cultivo. Tratamento 1: Testemunha (meio MS); Tratamento 2: 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; Tratamento 3: 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido 3-indolbutírico); Tratamento 4: 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose..... 47

Figura 10. Enraizamento da cultivar RB966928 de cana-de-açúcar em função de diferentes meios de cultura para enraizamento, plantas com 21 dias de cultivo. A) Testemunha (meio MS); B) MS/2 com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; C) 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido 3-indolbutírico); D) 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Barra: 1 cm..... 47

Figura 11. Porcentagem média de sobrevivência de plantas aclimatizadas de cana-de-açúcar cultivar RB966928, cultivadas por 30 dias em substrato Plantmax<sup>®</sup>. Tratamento 1: plantas cobertas com sacos plásticos e mantidas em sala de crescimento. Tratamento 2: plantas cobertas com sacos plásticos e mantidas em casa de vegetação. Tratamento 3: plantas sem cobertura e mantidas em casa de vegetação. Tratamento 4: plantas sem cobertura e mantidas em sala de crescimento..... 49

Figura 12. Aclimatização de plantas de cana-de-açúcar cultivar RB966928 cultivadas por 30 dias em substrato Plantmax<sup>®</sup>. 1) plantas mantidas com saco plástico e acondicionadas em sala de crescimento, 2) plantas mantidas com saco plástico e acondicionadas em casa de vegetação, 3) plantas mantidas sem saco plástico e acondicionadas em casa de vegetação, 4) planta sem saco plástico e mantidas em sala de crescimento. Barra 1 cm..... 50

## Capítulo II

Figura 1. Explante inicial de cana-de-açúcar cultivar RB966928, no sexto subcultivo, com três brotações, utilizado no trabalho..... 58

Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de sacarose em cana-de-açúcar cultivar RB966928. A) Comprimento da parte aérea (cm), B) comprimento da maior raiz (cm), C) número de raízes, D) peso fresco (g), E) peso seco (g), F) porcentagem de conteúdo de água nos explantes da cultivar de cana-de-açúcar RB966928..... 59

Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de sacarose em cana-de-açúcar cultivar RB966928. A) Tratamento com 0 g L<sup>-1</sup>, B) tratamento com 20 g L<sup>-1</sup>, C) tratamento

com 40 g L<sup>-1</sup>, D) tratamento com 60 g L<sup>-1</sup>, E) tratamento com 80 g L<sup>-1</sup>. Barra: 1  
cm..... 60

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1. Peso inicial, peso final, peso seco e rendimento relativo de biomassa (RRB) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB966928 cultivadas em biorreator de imersão temporária com variação da frequência de imersão..... 44

Tabela 2. Peso inicial, peso final, peso seco e rendimento relativo de biomassa (RRB) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB966928 cultivadas em biorreator de imersão temporária com variação no tempo de imersão..... 45

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) está entre as culturas mais importantes para o Brasil. No primeiro semestre de 2015 foi responsável por gerar uma renda de 108,53 bilhões de reais para o país (CEPEA, 2015). O Brasil é protagonista na produção mundial de cana-de-açúcar e açúcar, ocupando a primeira posição no ranking. A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015) prevê uma produção total de 663,11 milhões de toneladas de cana para a safra 2015/2016, o que representa um crescimento de 4,5% em relação à safra anterior (2014/2015), que somou 634,77 milhões de toneladas. Este crescimento no mercado sulcroalcooleiro se dá pela combinação de fatores favoráveis, tais como: crescimento da frota de carros “flex”, tendência em longo prazo de aumento dos preços internacionais do petróleo, baixo custo na produção de etanol, preocupação universal com fontes alternativas de energia (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011), além da valorização no preço do açúcar no mercado internacional (SOUZA, 2010).

Um dos fatores para o sucesso desta atividade econômica é o melhoramento genético com a seleção de novas cultivares, que busca desenvolver cultivares adaptadas às diversas regiões canavieiras, visando contornar problemas como o ataque de pragas, resistência a doenças e melhorar as características industriais e comerciais (ROSSE et al., 2002)

Segundo dados da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sulcroenergético (RIDESA, 2015) nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul a cultivar mais plantada foi a RB966928 com 17,3% seguido da RB867515 (16,7%). Já para a área cultivada a RB867515 ocupa a primeira posição com 26%, uma vez que esta cultivar foi a mais plantada durante várias safras. A RB966928 foi lançada pela Universidade Federal do Paraná em 2010, possui elevada sanidade às principais doenças, ciclo de maturação precoce, excelente adaptabilidade fenotípica, boa brotação cana-planta e cana-soca, além da boa adaptação a colheita mecanizada (RIDESA, 2010).

Apesar do bom desempenho das cultivares atuais no campo, a longo prazo o potencial de rendimento se deteriora, devido a segregação, suscetibilidade a doenças, insetos e mudanças edafoclimáticas, assim o melhoramento genético e a seleção de novas cultivares devem ser contínuos. Porém, a falta de multiplicação com rapidez

umenta o tempo para se completar um ciclo de seleção, levando de 10 a 15 anos para lançar uma nova cultivar no mercado (ALI et al., 2008).

Para atender a demanda do setor é necessário otimizar a produção de mudas. Neste sentido, a micropropagação é uma boa alternativa ao processo convencional de propagação vegetativa de cana-de-açúcar por colmos, já que é possível alcançar altas taxas de multiplicação em tempo e espaço reduzido, além de mudas de melhor qualidade (ETIENNE e BERTHOULY, 2002).

A técnica utilizada para regenerar o explante *in vitro* também é de fundamental importância. A cultura de meristemas é capaz de reproduzir fielmente as características genéticas da planta mãe, possibilita obter material com baixíssimo índice de perdas por contaminação, permite a eliminação de outros patógenos como vírus e bactérias devido a ausência de vascularização dos tecidos, reduz as chances de haver variação somaclonal quando comparado a embriogênese somática, além da economia de tempo quando comparada com outras técnicas convencionais (BIASI, PASSOS e POMER, 1998; GOMIDE, 2004; DUTRA et al., 2011).

A cultura de tecidos apresenta diversos benefícios, porém o seu sucesso depende de fatores como temperatura, fotoperíodo, umidade relativa, intensidade luminosa, genótipo, meio de cultura, concentração e tipos de reguladores vegetais, assepsia utilizada e habilidade do laboratorista (GEORGE, 2008).

O meio de cultura é responsável pela sustentação do explante e o fornecimento de nutrientes necessários para sua sobrevivência. Dentre os componentes do meio de cultura estão os macro e micronutrientes, reguladores de crescimento, vitaminas e uma fonte de carboidratos (CARVALHO, 2006).

A fonte e concentração de carboidratos presente no meio de cultura é o que define a sobrevivência do explante, já que o carbono exógeno é responsável pela fonte de energia, influenciando na fisiologia da planta, diferenciação e crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos (CALVETE, 2002).

Apesar dos benefícios, as técnicas convencionais de micropropagação apresentam dificuldades, requerem pequenos frascos em grande quantidade, estes devem ser trocados periodicamente, já que à medida que o explante cresce o espaço fica reduzido e os nutrientes presentes no meio sólido se esgotam (ETIENNE e BERTHOULY, 2002), o que acarreta intensa manipulação das culturas e possível contaminação. O uso do biorreator de imersão temporária é uma opção para a produção de mudas em larga escala, comparado à micropropagação convencional, apresenta

vantagens como: aceleração do processo de multiplicação, uniformização da produção, redução no custo total por unidade produzida e aumento da produtividade (RIBEIRO e BASTOS, 2008). O biorreator utiliza meio de cultura líquido, que possibilita a renovação do ar durante o cultivo e o monitoramento de alguns parâmetros: oxigênio dissolvido, pH, concentração de íons e temperatura (TEIXEIRA, 2002). A micropropagação aliada ao uso de biorreatores pode se tornar uma ferramenta importante na produção massal de mudas com qualidade superior a preços competitivos.

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação para a cultivar de cana-de-açúcar RB966928. Os objetivos específicos foram verificar a influência de citocininas no meio de cultura para a brotação de meristemas; avaliar a influência das concentrações de reguladores vegetais na fase de multiplicação; testar o tempo e frequência de imersão na multiplicação dos explantes em biorreator; avaliar quatro tipos de meio de cultura para o enraizamento da cultivar, testar a eficiência do uso de cobertura plástica em diferentes ambientes durante a aclimatização e avaliar o efeito de concentrações de sacarose no enraizamento.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 CANA-DE-AÇÚCAR**

A cana-de-açúcar foi domesticada pelos Polinésios devido ao seu teor de açúcar, mas ao longo do tempo ela passou a ser uma cultura multiuso provendo não só o açúcar, como também o etanol, bebidas alcoólicas, ração animal, produtos químicos, biofertilizantes e matérias-primas para a geração de energia (FAO, 2008).

Introduzida no Brasil em meados de 1530 por Martin Afonso de Souza, inicialmente a produção visava o açúcar, com o objetivo econômico para Portugal (BRAIBANTE et al., 2013). A cultura se adaptou bem ao país e desde então houve uma grande expansão do seu cultivo.

Atualmente o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar seguido pela Índia. Os dois países juntos são responsáveis por quase 60% da produção mundial (FAOSTAT, 2014). Segundo dados da CONAB (2015) a área cultivada de cana-de-açúcar no Brasil é

de 9.057,2 mil hectares, o que representa um acréscimo de 0,6% em relação à safra 2014/2015. O centro-sul é responsável por 87,5% da área cultivada, o Paraná ocupa a quinta posição com 6,8%. A produção de açúcar para a safra 2015/2016 está estimada em 37,63 milhões de toneladas e a de etanol de 28,82 bilhões de litros, um incremento de 5,8% e 0,5%, respectivamente, em relação à safra anterior.

Segundo Klein (2010) a cana-de-açúcar é uma gramínea semi-perene pertencente à família Poaceae, do gênero *Saccharum*, originária do sudeste da Ásia. Apresenta uma elevada taxa fotossintética e alta eficiência na utilização do gás carbônico, se caracterizando como uma planta de metabolismo C4, que concentra CO<sub>2</sub> nas células do mesófilo, o que permite aos estômatos reduzirem a condutância estomática e a transpiração (MARIN e NASSIF, 2012). Adapta-se a regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo cultivada entre as latitudes 35° N e 35° S (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). A temperatura ideal para a brotação e perfilhamento fica em torno de 25 e 30°C, em contrapartida as temperaturas abaixo de 20°C favorecem a maturação, neste período cessa o crescimento vegetativo e a planta passa a elaborar mais sacarose, que será acumulada nos colmos. Apesar de se adaptar bem em locais de altas temperaturas, intensa luminosidade e baixos potenciais hídricos, a cana-de-açúcar precisa de grandes quantidades de água, uma vez que 70% do seu peso é constituído por água e só 30% por massa seca dependendo do seu estágio fenológico (SEGATO, 2006, apud DIAS, 2011, p. 9). É uma planta de genoma complexo com número diploide de cromossomos variando entre 70 e 120 (D'HONT et al., 1996).

A propagação convencional de cana-de-açúcar é feita de forma vegetativa, utilizando o colmo das plantas. No plantio mecanizado é recomendado o uso de 20 t/ha de mudas e no manual de 12 a 15 gemas/metro de sulco (LANDELL et al., 2012). A propagação por meio de colmos é lenta e mais susceptível a doenças. Para a cana-de-açúcar, a micropropagação é bastante vantajosa, considerando que um dos maiores problemas enfrentados em programas de melhoramento genético convencionais nessa cultura é a dificuldade de multiplicar o material selecionado com rapidez (KNEIB, 2007).

## 2.2 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto. Ela recebe este nome devido ao tamanho dos propágulos utilizado. Esta técnica tem o objetivo de regenerar plantas idênticas à planta mãe. Isto é possível, pois os propágulos (células, tecidos ou órgãos) são mantidos em meio de cultivo sob condições assépticas com controle de densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo, temperatura, dentre outros (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; GEORGE, 2008; CARVALHO et al., 2013).

Esta é uma técnica que possibilita a produção em larga escala de plantas saudáveis. Ela se baseia na teoria da totipotência, segundo a qual, células únicas são capazes de regenerar um organismo inteiro (GEORGE, 2008). É um método muito estudado para várias espécies vegetais, hortícolas (batata e cenoura), ornamentais (orquídea, crisântemo e cravos), frutíferas (abacaxi, morango e banana), medicinais (ipeca e espinheira santa) e mais recentemente em espécies florestais (pinus e eucalipto) (CARVALHO, SILVA e MEDEIROS, 2006).

Alguns fatores podem influenciar no sucesso da propagação *in vitro* como: a temperatura, fotoperíodo, umidade relativa, intensidade luminosa, genótipo, meio de cultura, concentração e tipos de reguladores vegetais, assepsia utilizada e habilidade do operador (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; GEORGE, 2008).

Os reguladores de crescimento vegetal são fundamentais para a micropropagação, pois são responsáveis por suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios do explante, estimulando respostas como enraizamento, alongamento, multiplicação de parte aérea ou crescimento. São substâncias orgânicas ou químicas sintéticas, não produzidas pelas plantas, com ação semelhante à dos hormônios que atuam no metabolismo vegetal. Em pequenas quantidades promovem respostas fisiológicas, modulando e regulando o crescimento de diversos órgãos vegetais (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; GEORGE, 2008; LEMOS, 2013).

Os reguladores de crescimento mais importantes são do grupo das citocininas e auxinas, sendo considerados vitais para a planta. A interação entre eles regula a direção da morfogênese e promove crescimento e divisão celular. A relação citocinina/auxina alta resulta na indução de brotação nos explantes e a menor relação induz o processo de rizogênese. Apesar disso, a combinação ótima entre os dois varia entre plantas e até

mesmo em cultivares dentro da mesma espécie (MACHAKOVA et al., 2008; TAIZ E ZEIGER, 2009; RIGHETO, 2011).

A cultura de tecidos busca fidelidade clonal através de suas técnicas. O processo é assexuado, envolvendo divisões mitóticas, que teoricamente não causariam qualquer variação genética (OLIVEIRA, 2012; FRANCO, 2013), porém é comum observar o surgimento de plantas com características morfológicas distintas da planta mãe, principalmente quando o número de repicagens é excessivo ou quando elas passam pela fase de calo. Os distúrbios que ocorrem durante a divisão mitótica são ocasionados pelo estresse da micropropagação e são denominados variações somaclonais (CANÇADO et al., 2009).

A micropropagação apresenta vantagens, como: melhores condições sanitárias, reprodução fiel do genótipo da planta-mãe, propagação de espécies difíceis de propagar por outras técnicas, redução da área e tempo necessários para a propagação da cultura e obtenção de várias plantas a partir de um único explante (CARVALHO, SILVA e MEDEIROS, 2006).

### 2.2.1 Micropropagação em cana-de-açúcar

A micropropagação apresenta ferramentas valiosas para a propagação da cana-de-açúcar, uma vez que é possível produzir mudas saudáveis em larga escala, em tempo e espaço reduzidos (CIDADE et al., 2006). Isso é uma grande vantagem quando comparado à propagação convencional feita por colmos, que é passível de transmissão de doenças, além da perda de material que poderia ser encaminhado para o beneficiamento e é usado no plantio. Há também o benefício para os programas de melhoramento, que são prejudicados pelo grande período de tempo para se obter mudas, levando cada ciclo de seleção a durar de 10 a 15 anos (ALI, 2008).

A cultura de tecidos utilizando a cana-de-açúcar teve início em 1964 por Nickell que induziu raízes em calos; Poucos anos depois, em 1969, Barba e Nickell; Heinz e Mee regeneraram plantas completas de cana a partir de calos. Nas décadas seguintes vários outros trabalhos surgiram em diferentes campos de aplicação da cultura de tecidos (LEMOS, 2013). Atualmente já existem diversos trabalhos que abordam a cultura de tecidos em cana com diferentes processos de regeneração como: meristemas

apicais e axilares, ápices caulinares e tecidos de folhas imaturas, por processos de embriogênese somática e organogênese (NOGUEIRA, 2013).

A micropropagação através de meristemas é um dos métodos mais viáveis para obter material sadio. Por apresentar células indiferenciadas há poucas possibilidades de presença de patógenos. Além disso, reproduzem plantas fenotipicamente semelhantes à planta mãe, minimizam a incidência de variação somaclonal por não passarem pela fase de calo no desenvolvimento e garantem produção de um grande número de mudas, durante o ano inteiro (ALI et al., 2008; ALCANTARA et al., 2014). Dada a importância da cultura de meristemas, protocolos estão sendo desenvolvidos para algumas cultivares, como para a RB855156 que teve seu protocolo desenvolvido por Dutra et al. (2011) e a RB867515 que teve o protocolo otimizado por Vieira et al. (2009).

A utilização do meio de cultivo adequado para a cultura é de fundamental importância. Para a cana a maioria dos trabalhos utilizam meios semissólidos para o estabelecimento e meios líquidos para a etapa de multiplicação, nesta fase a presença de ágar é dispensada. A composição básica do meio recomendada utiliza os sais minerais do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), modificações substanciais são feitas dependendo da cultivar e do propósito do estudo. Estas modificações normalmente variam entre concentrações e combinações de reguladores vegetais (LEMOS, 2013).

Os reguladores vegetais são amplamente utilizados, os mais empregados são auxinas e citocininas, apesar disto outros reguladores como giberelinas também são encontrados na literatura. Crispim et al., (2014) avaliou o efeito do benzilaminopurina e da cinetina sobre o potencial morfogênico da cultivar POJ Branca de cana-de-açúcar. Alcantara et al. (2014) otimizou a multiplicação, alongamento e enraizamento com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico nas cultivares RB036091, RB036152, RB036066. Gopitha *et al.* (2010) avaliou diferentes tipos de auxinas e citocininas na indução de calos, brotações e enraizamento da cultivar CO 671.

A cana-de-açúcar está entre as primeiras plantas que apresentaram variações em características citogenéticas e enzimáticas. Desde então, a variação somaclonal em cana tem sido constantemente observada, particularmente em plantas que passaram pela fase de calo, que envolve exposição a níveis elevados de auxina (3 a 5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D) e longos períodos de cultivo, mais de 12 semanas. Estudos mostram que alguns genótipos de cana são mais propensos a mutações genéticas do que outros e que a instabilidade *in vitro* é, possivelmente, consequência entre o genótipo e o meio. Explantes de espécies

com elevada ploidia apresentam maior variabilidade inerente do que aqueles com baixa ploidia (SNYMAN et al., 2011).

A variação somaclonal é indesejável para a produção clonal e massal de mudas, uma vez que se deseja regenerar plantas idênticas a planta mãe, porém a instabilidade genética pode ser uma ferramenta para o melhoramento vegetal, colaborando na seleção de materiais de interesse agrônômico, já que é possível ter variações para diferentes parâmetros como: rendimento, resistência à doença, tolerância à seca e maturidade (MELO, 2011; SHAHID et al., 2011).

É de grande valia desenvolver protocolos eficientes que visam o estabelecimento da cultura *in vitro*, já que a resposta morfogênica não é influenciada apenas entre espécies, mas também dentro de cada genótipo e já foram observadas respostas diferentes durante o estabelecimento (CALVETE et al., 2002; ALCANTARA et al., 2014).

### 2.2.2 Influência da sacarose na micropropagação

O uso de uma fonte de carbono na cultura de tecidos é fundamental para a sobrevivência das plantas. Uma vez que as condições ambientais são desfavoráveis para a realização da fotossíntese, as plântulas perdem parcialmente o autotrofismo. A melhor fonte depende da espécie da planta e da fase que se encontra na micropropagação (NICOLOSO et al., 2003; DIGNART, 2006). A fonte de carbono mais utilizada é a sacarose, com concentração de 2 e 3% para o meio de multiplicação e enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; THORPE et al., 2008).

A sacarose fornece carboidrato prontamente disponível nos meios de cultura, tendo efeito sobre a multiplicação e o crescimento das plântulas micropropagadas. Concentrações muito baixas podem acarretar clorose das folhas cultivadas, já concentrações muito altas podem ocasionar problemas de excessivo potencial osmótico do meio, o que leva a deterioração das culturas (DIGNART, 2006).

Calvete et al. (2002), avaliaram a influência da concentração de sacarose no enraizamento do morangueiro *in vitro*, e concluíram que houve aumento crescente da biomassa da raiz até a dosagem de 45 g L<sup>-1</sup>. Resultados próximos foram encontrados para o ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*), o número de raízes apresentou

comportamento quadrático em relação às concentrações de sacarose (15, 30, 45, 60 e 70 g L<sup>-1</sup>) cuja concentração de máxima eficiência técnica estimada ficou entre 30 e 45 g L<sup>-1</sup>, além de promover maior índice de aclimatização (SKREBSKY et al., 2006).

Schmidt et al. (2007) testaram o efeito da concentração de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>) no enraizamento do mamoeiro e notaram que a concentração que promoveu o máximo enraizamento de segmentos nodais foi de 25 g L<sup>-1</sup> com um percentual de enraizamento de 44,7% e as concentrações de 45 e 60 g L<sup>-1</sup> promoveram 19% e 6% respectivamente. A presença de sacarose em concentrações moderadas (22 g L<sup>-1</sup>) em coco (*Cocos nucifera* L.) diminuiu a fotossíntese, porém aumentou a sobrevivência, sugerindo que tanto a fotossíntese *in vitro* como as reservas de sacarose exógenas contribuem para o estabelecimento a campo e o crescimento das plântulas (FUENTES et al., 2005).

Mothé et al. (2008) constataram que maiores concentrações de sacarose produziram maior biomassa em cana-de-açúcar. Tratamentos com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose foram incapazes de produzir biomassa pela falta de carboidratos para suprir suas necessidades metabólicas, já os tratamentos com 40 e 50 g L<sup>-1</sup> promoveram grandes acréscimos de biomassa e produção de raízes. Khan et al. (2006) obtiveram resultados parecidos, também em cana-de-açúcar cultivares NIA-2004, BL4 e NIA-98, sugerindo que 4% de açúcar comercial no meio é ideal para a regeneração e multiplicação, para o enraizamento o recomendado é 6%. A combinação de 5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético + 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio apresentou resposta significativa para o enraizamento em cana-de-açúcar (cultivar CoJ- 85) quando comparado a combinação de 5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético + 30g L<sup>-1</sup> de sacarose há uma resposta reduzida para o enraizamento (SINGH, 2003).

A variação da concentração de sacarose, na cultura de tecidos, próximo a aclimatização é relatado em alguns trabalhos. Skrebsky et al. (2006), sugerem que manter níveis de 30 g L<sup>-1</sup> ou superiores são importantes, pois aumentam as reservas de carboidratos nas folhas, elevando a energia disponível para as plantas no processo de aclimatização. Por outro lado, Leite et al. (2000) e Dignart (2006) sugerem que os níveis de sacarose antes da aclimatização devem ser reduzidos a concentrações abaixo de 30 g L<sup>-1</sup>, visando promover a fotossíntese e habituar a planta à nutrição fotoautotrófica para facilitar a aclimatização da planta. Thorpe et al. (2008) e Grount (1988) afirmam que a presença de carboidrato exógeno no meio de cultura prejudicam significativamente a

atividade da enzima fixadora de carbono RubPcase, inibe a formação de clorofila e fotossíntese em algumas culturas *in vitro*.

O nível de sacarose presente no meio de cultura é um dos fatores que influenciam na eficiência da cultura de tecidos, uma vez que ela interfere diretamente na morfogênese das plantas, podendo acelerar o processo de regeneração. Mas para isto estudos devem ser desenvolvidos, já que a concentração ótima para induzir a morfogênese ou crescimento difere entre os diversos genótipos (THORPE et al., 2008).

### 2.3 MULTIPLICAÇÃO EM BIORREATORES

Os biorreatores são utilizados na micropropagação clonal e visam facilitar o trabalho rotineiro e melhorar as condições ambientais e assépticas da produção massal de mudas (SCHEIDT, 2008). São equipamentos para cultivos sob imersão permanente ou temporária de gemas, embriões, células ou qualquer tipo de propágulo que possa ser utilizado (TEIXEIRA, 2002).

Os biorreatores surgiram a partir de equipamentos desenvolvidos para o cultivo de bactérias e fungos para fins industriais, os chamados fermentadores. Para sua utilização na produção de embriões, algumas modificações foram feitas como: presença de sensores para monitoramento da temperatura, da velocidade de agitação do meio líquido, do pH, do oxigênio dissolvido, do potencial redox e do dióxido de carbono (RIBEIRO e BASTOS, 2008).

O primeiro uso do biorreator para produção vegetal foi para micropropagar begônia em 1981 por Takayama e Misawa. Os autores utilizaram *in vitro* segmentos nodais seguindo protocolos de cultivos convencionais em meio gelificado (TEIXEIRA, 2002). Atualmente o uso de biorreatores já foi descrito para diversas espécies como: embriogênese somática de *Pinus radiata*, micropropagação de abacaxi, cacau, café (OLIVEIRA et al., 2011), formação de mudas e microtubérculos de batata (WU, 2007), jacarandá (NASCIMENTO, FERREIRA e MALOSSO 2012) e helicônia (RODRIGUES et al., 2006).

Vários tipos de biorreatores têm sido desenvolvidos com potencial para a micropropagação, porém, independente do tipo a estrutura básica é a mesma, composta por: frasco de cultivo, motor elétrico conectado a um eixo que se estende até o interior

do frasco, bomba compressora de ar, sensores de temperatura, pH e oxigênio (TEIXEIRA, 2002).

O sistema de biorreator de imersão temporária (BIT) patenteado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utiliza frascos dispostos lado a lado, onde um contém o meio nutritivo e o outro o material vegetal. Os frascos são interligados por um tubo e o meio líquido é transferido de um para o outro através de fluxo de ar. Este sistema foi baseado no modelo proposto por Alvard et al. (1993) e Lorenzo et al. (1998), que permite uma grande versatilidade de uso, visto que este modelo pode ser adaptado para funcionar sob regime de imersão contínua podendo-se programar o borbulhamento, dependendo da necessidade do explante (TEIXEIRA, 2001; TEIXEIRA, 2002).

Estes equipamentos têm aumentado a eficiência, produtividade da propagação de plantas com redução no tempo requerido para micropropagação. Estes benefícios são possíveis pelo maior contato da cultura com o meio de cultivo; manuseio mais simples da cultura; economia de tempo das operações e mão de obra; a renovação do ar durante o cultivo, que estimula o crescimento; agitação da cultura no biorreator, que resulta na perda de dominância apical e proporciona o crescimento de maior número de brotações nos explantes e mudança na composição do meio por simples transferência (DUTRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, proporciona o monitoramento de alguns parâmetros como: pH, oxigênio dissolvido, temperatura e concentração de íons (TEIXEIRA, 2002).

Apesar de todos os benefícios, os biorreatores apresentam desafios como a contaminação nas fases iniciais de estabelecimento do material vegetal e na manutenção do cultivo *in vitro* (MÁXIMO, 2014). Devido ao uso do meio líquido, é comum que explantes cultivados em biorreatores apresentem excesso de água nas células e tecidos, conhecido como hiperidricidade ou vitrificação. Isto acontece devido à alta umidade relativa dentro do frasco, o que implica na baixa taxa transpiratória e excessiva absorção de água pelos tecidos com a formação de novas células que se tornam túrgidas (VASCONCELOS et al., 2012). Plantas acometidas por esta desordem fisiológica apresentam brotos alongados e espessos em diâmetro, entrenós mais curtos, folhas espessadas, frequentemente alongadas, enrugadas e quebradiças, com aspecto vítreo (OLIVEIRA et al., 2014). A hiperidricidade pode ser contornada ajustando a frequência e o tempo de imersão do material vegetal no meio de cultivo e também os intervalos de aeração. Além de evitar a vitrificação estes são fatores fundamentais para obter um

maior coeficiente de multiplicação e melhor qualidade das plantas (MAXIMO, 2014; OLIVEIRA et al., 2014)

O método de cultivo de plantas em biorreatores é relativamente novo e ainda pouco difundido. Alguns autores descrevem o uso de biorreatores na micropropagação de cana-de-açúcar com sucesso. Lorenzo et al. (1998) utilizaram biorreator para formação de brotações (cultivar C-1051-73) e constataram que a taxa de multiplicação duplicou e os custos foram reduzidos em 46% quando comparados ao método convencional de micropropagação. Snyman et al. (2007) cultivaram explantes iniciais de cana em sistema de imersão temporária e observaram um aumento de 19 vezes no número de plantas regeneradas, quando comparado ao cultivo convencional em placas de Petri. Lorenzo et al. (2001), compararam plantas obtidas por biorreator de imersão temporária, micropropagação convencional e macropropagação convencional, os resultados mostraram que as plantas provenientes dos três métodos de propagação não diferiram após o nono mês de crescimento em campo

## 2.4 REFERÊNCIAS

ALCANTARA, G. B.; MACHADO, M. P.; RIBEIRO, D. S.; WIPPEL, H. H.; FILHO, J. C. B.; OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E. Multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações *in vitro* de clones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 5, N.1: p. 20-25, Fev. 2014.

ALI, A.; NAZ, S.; SIDDIQUI, F. A.; IQBAL, J. An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 139–149, 2008.

ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 32, n.1, p. 55-60, 1993.

BARBA, R.; NICKELL, L.G Nutrition and organ differentiation in tissue culture of sugarcane, a monocotyledon. **Planta**, Berlin, v.89, p. 299-302, 1969.

BIASI, L. A.; PASSOS, I. R. DA S.; POMMER, C. V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Scientia Agricola**. Piracicaba, V.55, n.2, mai./ago. 1998.

BRAIBANTE, M. E. F.; PAZINATO, M. S.; ROCHA, T. R.; FRIEDRICH, L. S.;

NARDY, F. C. A cana-de-açúcar no Brasil sob um olhar químico e histórico: uma abordagem interdisciplinar. **Química nova na escola**, v.35, n. 1, p. 3-10, FEV. 2013.

CALVETE, E. O.; KAMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura brasileira**, v. 20, n. 2, p. 186–191, 2002.

CANÇADO, G. M. A. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.253, p.64-74, 2009.

CARVALHO, M. F. C. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. Fatores inerentes à micropropagação. **EMBRAPA Algodão**. Campina Grande, 2006.

CEPEA. **Cadeias da cana e da bovinocultura de corte registram crescimento no primeiro semestre do ano**. Relatório do PIB das Cadeias – Primeiro semestre 2015. Disponível em <[http://www.cepea.esalq.usp.br/pibpec/PIB\\_Cadeias\\_2tri\\_2015.pdf](http://www.cepea.esalq.usp.br/pibpec/PIB_Cadeias_2tri_2015.pdf)>. Acesso em: 2 nov. 2015.

CIDADE, A. P.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.3, p.385-391, mar. 2006

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 62-89. 2011.

CRISPIM, J. G.; MONTEIRO, M.; RÊGO, D.; et al. Efeito do benzilaminopurina e da cinetina sobre potencial morfogênico de cana-de-açúcar. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 35, p. 94–99, 2014.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-Açúcar**. V.2 – Safra 2015/2016, N.2-Segundo levantamento, Brasília, p.1-33, ago. 2015.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular Genetics and Genomics**, 25:405-413, 1996.

DIAS, C. M. O. **Indicadores fisiológicos, fitotécnicos e agroindustriais de variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob duas condições hídricas**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros. Janaúba. 2011.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropropagação de *cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas**. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Agronomia. Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2006.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49-59, jan/jun. 2009.

DUTRA, L. F.; DONINI, L. P.; SILVA, S. D. dos ANJOS.; SILVA, N. D. G.; THIEL, F. B.; VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M. Protocolo de micropropagação em de cana-de-açúcar. Circular Técnica. **Embrapa**, Pelotas, 2011.

ETIENNE. H; BERTHOULY, M. Temporary Immersion Systems in Plant Micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Kluwer Academic Publishers. P. 215-231, 2002.

FAO. **Micropropagation for quality seed production in Sugarcane in Asia and the Pacific**. 2008.

FAOSTAT. **Production/Crops**. Disponível em <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em 10 de fev. 2016.

FRANCO, M. C. **Micropropagação e transformação genética de pinhão-manso (J. curcas L.)**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado Agronomia) – Instituto Agrônomo, Campinas. 2013.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; OROPEZA, C.; DESJARDINS, YVES.; SANTAMARIA, J.M. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** – Plant, v. 41, p. 69-76, Jan. 2005.

GEORGE, E. F. The Components os Plant Tissue Media II. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Netherlans, Springer. V. 1, p. 115 - 174, 2008.

GOMIDE, D. G. **Influência do número de subcultivos na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de plantas micropropagadas de morangueiro**. 93 f. Dissertação (Mestrado Agronomia/Produção Vegetal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2004.

GOPITHA, K.; BHAVANI, A. L.; SENTHILMANICKAM, J. Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. India, v. 1, p. 1-7, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa – CNPH, 1998. p. 183-260.

GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stresses of transplanting. **Acta Horticulturae**, Leuven, n.230, p.129- 134,1988.

HEINZ, D. J.; MEE, G. W. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science**, Madison, v. 9, p.346-348,1969.

KLEIN, V. **Características agronômicas, químicas e bromatológicas de variedades de cana-de-açúcar para uso forrageiro**. 2010. 31 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás. Jataí. 2010.

KNEIB, R, B *et al.* Estudo da indução de variação genética em clones de cana-de-açúcar através de marcadores microsatélites. **Simpósio Estadual de Agroenergia – IV reunião técnica de agroenergia** – RS, Pelotas. 2007.

LANDELL, M. G. A. Sistema de multiplicação de cana de açúcar com o uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. **Documentos**, IAC, Campinas, 109, 2012. Instituto Agrônomo de Campinas, 2012. 16 p.

LEMO, E. E. P. Micropropagação da cana-de-açúcar. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. SILVA. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 279-308.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “in vitro” do porta-enxerto de pereira OH X F97. **Ciência Agrotécnica**, v.24, n.2, p.353-357, abr./jun., 2000.

LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in na improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, n. 197-200,1998.

LORENZO, J. C.; OJEDA, E.; ESPINOSA, A.; BORROTO, C. Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 6, p. 803–806, 2001.

MACHAKOVA, I. ZAZIMALOVA, E. GEORGE, E. F. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Netherlands, Springer. V. 1, p. 115 - 174, 2008.

MARIN, F; NASSIF, S. P. Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.17, n.2, p.232–239, 2012.

MÁXIMO, W. P. F. **Propagação de um híbrido comercial de *Eucalyptus urograndis* em biorreator de imersão temporária (BIT)**. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2014.

MELO, M. M. **Instabilidade fenotípica na variedade RB872552 de cana-de-açúcar: marcadores ISSR e enzimas do sistema antioxidativo**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Rural de Pernambuco. Recife. 2011.

MOTHÉ, G. P. B.; NETTO, A. T.; CRESPO, L. E. C.; CAMPOSTRINI, E. Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e qualidade de luz. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.4, n.2, p. 84-91, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum** 15:473-479, 1962.

NASCIMENTO, M.M; FERREIRA, M. A. C; MALOSSO, M. G. Produção de mudas de carobinha (*Jacaranda decurrens* Cham.) em sistema de imersão temporária com biorreatores do tipo R.I.T.A. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, Vol. 14, n. 2, 2012.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] Cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 84–90, 2003.

NICKELL, L. G. Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. Hawaii **Plant Records**, v. 57, p. 223-229,1964.

NOGUEIRA, G. F. **Regeneração, conservação *in vitro* e estabilidade genômica em cana-de-açúcar**. 2013. 195 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.

OLIVEIRA, M. L. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, 39, n. 91, p. 309-315, 2011

OLIVEIRA, K. C. **Caracterização genotípica de plantas matrizes de cafeeiros e de suas progênes clonais obtidas por embriogênese somática**. 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Instituto Agronômico, Campinas. 2012.

OLIVEIRA, M. L. DE; XAVIER, A.; FILHO, R. M. P.; REIS, J. P. DOS. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 37–45, 2014.

RIBEIRO, J. M; BASTOS, D. C. Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais. Embrapa Semi-Árido. **Documentos**, 214. Petrolina, 2008.

RIDESA. Catálogo Nacional de Variedades “RB” de cana-de-açúcar. **Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro**. – Curitiba, 2010.

RIGHETO, M. V. L. **Análise morfofisiológica de microplântulas de *Cattleya labiata* Lensley e *Cattleya eldorado* Linden (Orchidaceae) sob efeito do paclobutrazol.** 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 2011.

RODRIGUES, P. H. V. *et al.* Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.1, 2006.

ROSSE, L. N.; VENCOVSKY, R.; FERREIRA, D. F. Comparação de métodos de regressão para avaliar a estabilidade fenotípica em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 25–32, 2002.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sacarose na fase de enraizamento in vitro de mamoeiro ‘Tainung 01’. **Scientia Agraria**, v.8, n.1, p.25-31, 2007.

SHEIDT, G. N. **Desenvolvimento e validação de um biorreator do tipo imersão por bolhas para micropropagação de plantas.** 2008. 105 f. Tese (Doutorado – Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.

SINGH, R. **Tissue culture studies of sugarcane.** 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Thapar Institute of Engineering and Technology. Patiala, 2003.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida in vitro sob diferentes doses de sacarose. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 5, p. 1416–1423, 2006.

SNYMAN, J. S.; MEYER, G. M.; KOCH, A. C.; BANASIAK, M. WATT, M. P. Applications of in vitro culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. v.47, p. 234-249, mai. 2011.

SNYMAN, S. J.; MEYER, G.M.; RICHARDS, J. R.; RAMGAREEB, S.; BANASIAK, M.; HUCKETT, B. Use of the temporary immersion RITA<sup>®</sup> bioreactor system for micropropagation of sugarcane. **South African Journal of Botany**, Scottsville, v. 73, n. 2, p. 336-337, 2007.

SOUZA, M. A. A dinâmica territorial do agronegócio sucroalcooleiro e o zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar: notas para um debate. **Revista Pegada**, vol. 11, n.1. p. 172-191, 2010

TEIXEIRA, J. B. Biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. **II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 2001.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores: Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais - Produção de mudas em larga escala. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº 24, p. 36-41. 2002.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E. C.; KLERK, G-J; ROBERTS, A.; GEORGE, E. F. The Components os Plant Tissue Media II. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Netherlans, Springer. V. 1, p. 115 - 174, 2008.

ULISSES, C. *et al.* Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 7, p.86-91, 2010.

VASCONCELOS, A. G. V. DE; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, p. 837–844, 2012.

VIEIRA, R. A.; SILVA, C. M.; 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 RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v.4, n.1, p. 122-126, jan/dez. 2009.

WU, C. K. **Formação de Mudanças e Microtubérculos de Batata (*Solanum tuberosum* L.) em Sistemas Biorreatores**. 2007. 95 f. Tese (Mestrado - Agronomia). Instituto Agrônômico. Campinas. 2007.

### 3 CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DA CULTIVAR RB966928 DE CANA-DE-AÇÚCAR

#### RESUMO

Protocolos de micropropagação viabilizam a produção massal de mudas e ajudam a acelerar o processo de obtenção de novas cultivares. Para a cana-de-açúcar o desenvolvimento de protocolos são importantes, visto a grande gama de genótipos existentes. Assim o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para a produção de mudas *in vitro* da cultivar RB966928 de cana-de-açúcar. Para a brotação de meristemas foram feitos dois tratamentos: meio de cultura MS com 0 mg L<sup>-1</sup> de cinetina e 0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e meio de cultura MS com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Para a multiplicação avaliou-se as concentrações de 0; 0,2; 0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP em meio MS. Para a multiplicação em biorreator de imersão temporária avaliou-se as frequências de imersão de 1 vez ao dia, 4 vezes ao dia e 8 vezes ao dia e os tempos de imersão de 5, 10 e 25 minutos. Para o enraizamento utilizou-se os meios de cultura MS, MS com redução dos sais pela metade, MS com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB e MS com 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para a aclimatização variou-se a presença e ausência de uma cobertura com saco plástico para o crescimento das plantas e os locais de acondicionamento: sala de crescimento e casa de vegetação. A maior porcentagem de meristemas brotados foi obtida utilizando meio de cultura suplementado com citocininas. As concentrações crescentes de BAP elevaram as taxas de brotações adventícias, porém as concentrações mais altas reduziram o crescimento da parte aérea, assim a melhor dosagem para multiplicação da cultivar foi a de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. No biorreator a melhor frequência de imersão foi de 4 vezes ao dia e o tempo de 5 minutos de imersão. Para o enraizamento as plantas suplementadas com 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram maior crescimento de raízes e na aclimatização as plantas podem ser mantidas sem a cobertura do saco plástico e em casa de vegetação sem grandes prejuízos. Desta forma foi possível desenvolver um protocolo de micropropagação para a cultivar RB966928.

**Palavras chave:** *Saccharum* spp., meristema, biorreator.

### 3 CHAPTER I: DEVELOPMENT OF A PROTOCOL FOR MICROPROPAGATION OF SUGARCANE CULTIVAR RB966928

#### ABSTRACT

Micropropagation protocols enable the mass production of seedlings and help to speed up the new cultivars selection process. For sugarcane the protocols are important due the vast range of existing genotypes. So the objective of this study was to develop a protocol for production of seedlings *in vitro* of sugarcane cultivar RB966928. For regeneration of meristems two treatments were tested: culture media MS with 0 mg L<sup>-1</sup> kinetin and 0 mg L<sup>-1</sup> BAP and culture media MS with 0.1 mg L<sup>-1</sup> kinetin and 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP. For multiplication were tested concentrations of 0, 0.2, 0.5 e 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP with culture media MS. For bioreactor multiplication it was evaluated immersion times 1 time a day, 4 times a day to 8 times a day and dipping frequency of 5, 10 and 25 minutes. For rooting it was used MS culture media, MS with salts reducing by half, MS with 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB and MS with 70 g L<sup>-1</sup> sucrose. For acclimatization varied the presence and absence of a plastic cover for the growth of plants and packaging site: growth chamber and greenhouse The highest percentage of regenerated meristems was obtained using culture media supplemented with cytokinins. Increasing doses of BAP raise the adventitious shoots rates, however the higher concentrations reduced the shoot increase, thus the better dosage for multiplication of cultivar was 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP. In bioreactor the better immersion frequency was 4 times a day and immersion time of 5 minutes. For rooting plants supplemented with 70 g L<sup>-1</sup> sucrose showed greater growth of root and acclimatization plants can keep without plastic cover and in greenhouse with no major losses. Therefore was possible to develop a micropropagation protocol for sugarcane cultivar RB966928.

**Keywords:** *Saccharum* spp, meristem, bioreactor.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa uma posição de destaque no cenário mundial na produção de cana-de-açúcar e seus derivados. A cultura é responsável por gerar empregos diretos e indiretos, além de incrementar a economia do país. Mundialmente a cana é a fonte mais importante para produção de açúcar. Outros derivados como o etanol também ocupam posição de destaque, uma vez que são capazes de substituir recursos finitos como os combustíveis fósseis.

Para o sucesso da cultura é fundamental o uso de cultivares que apresentem boas características agrônômicas e agroindustriais. No censo realizado pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sulcroenergético (RIDESA) em 2015 nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul a cultivar mais plantada foi a RB966928. Esta é uma cultivar que apresenta boa brotação em soqueira, alto perfilhamento em cana-planta e em cana-soca, possui elevada sanidade às principais doenças e boas características agroindustriais.

Aliado ao uso de cultivares de qualidade está a formação de lavouras com mudas de excelência. A micropropagação pode contribuir significativamente para a produção de cana, apresentando-se como uma boa alternativa ao plantio convencional, já que possibilita a produção massal de mudas em tempo e espaços reduzidos além da eliminação de microorganismos potencialmente fitopatogênicos (MOTHÉ et al., 2008).

A cultura de tecidos é capaz de regenerar plantas completas utilizando tecidos meristemáticos ou não meristemáticos como fonte de explantes iniciais. Já existem protocolos descritos para a regeneração da cana-de-açúcar utilizando a organogênese direta e indireta, meristemas apicais e axilares e tecidos de folhas imaturas (LEMOS, 2013). Porém, existe uma grande variabilidade na resposta morfogênica do material cultivado *in vitro*, não apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da mesma espécie, o que leva a necessidade de definir protocolos diferenciados (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Protocolos eficientes são importantes, pois viabilizam a produção em larga escala e aceleram o processo de melhoramento de novas cultivares. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação para a cultivar RB966928 de cana-de-açúcar, testando a influência da presença de citocininas

na brotação dos meristemas, o efeito das concentração de 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro*, a frequência e o tempo de imersão em biorreator durante a multiplicação dos explantes, diferentes meios de cultura para o enraizamento e a utilização de cobertura plástica em diferentes ambientes durante a aclimatização.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Local de realização, origem do material e assepsia

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

Mini toletes de cana-de-açúcar cultivar RB966928 com 8 meses de idade, cedidos pela RIDESA, foram plantados em bandejas plásticas furadas contendo substrato Plantmax<sup>®</sup> e mantidos em casa de vegetação. Depois de brotados e com comprimento médio de 20 cm retirou-se palmitos de aproximadamente 5 cm de altura. Os palmitos foram desinfestados, em câmara de fluxo laminar, com álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos e então enxaguados três vezes com água deionizada esterilizada. Depois de esterilizados, um a um os palmitos eram colocados em placas de Petri contendo cisteína (50 mg L<sup>-1</sup>) autoclavada e com auxílio de um estereomicroscópio as folhas mais externas dos palmitos foram retiradas e o meristema isolado (tamanho aproximado de 1 mm) de acordo metodologia descrita por Alcantara et al. (2014a).

### 3.2.2 Meio de cultura para indução de brotação dos meristemas

Para avaliar as brotações dos meristemas foram feitos dois tratamentos utilizando o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) semissólido, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. O primeiro tratamento foi composto apenas de meio de cultura MS, no segundo foram acrescentadas as citocininas:

0,1 mg L<sup>-1</sup> de CIN (cinetina) e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), o pH dos dois tratamentos foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Utilizou-se 5 ml de meio em frasco de 20 ml de volume. O material foi mantido em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, no escuro por sete dias para a indução de brotações e sob luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h, nas fases posteriores. Após 21 dias avaliou-se a presença de brotação ou não em cada meristema. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento e um meristema por repetição. Os resultados foram avaliados pelo teste de hipóteses qui quadrado.

### 3.2.3 Multiplicação das brotações

Para testar a multiplicação das brotações utilizou-se meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) líquido, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de CIN e BAP variando nas seguintes concentrações 0; 0,2; 0,5; 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Para cada um dos tratamentos foram feitas 5 repetições com 10 explantes cada. O explante inicial tinha 3 brotações conforme a Figura 1. O pH dos tratamentos foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Utilizou-se 40 ml de meio em frascos de 200 ml de volume. O material foi mantido em sala de crescimento a 25 ± 2 °C e sob luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h. Após 15 dias foi avaliada a altura dos explantes (cm), quantidade de raízes (n<sup>o</sup>) e taxa de brotação por explante (n<sup>o</sup>).



Figura 1. Explante inicial de cana-de-açúcar, cultivar RB966928 utilizado nos experimentos de multiplicação, multiplicação em biorreator e enraizamento. Barra: 1 cm.

### 3.2.4 Multiplicação em Biorreator

Na multiplicação em Biorreator de Imersão Temporária (BIT) utilizou-se meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) líquido, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de CIN e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, o pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem. Foram avaliados a frequência de imersão e o tempo de imersão. No primeiro caso testou-se as frequências: 1 vez ao dia, 4 vezes ao dia e 8 vezes ao dia, com o tempo de imersão de 5 minutos e aeração a cada uma hora. Para testar o tempo de imersão foram utilizados os seguintes tratamentos: 5 minutos, 10 minutos e 25 minutos, com uma frequência de 4 vezes ao dia e aeração a cada uma hora. Cada tratamento contou com 5 repetições e 10 explantes por repetição. Nos dois experimentos utilizou-se o BIT patenteado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Figura 2), com garrafas de 5 litros e 500 ml de meio de cultura. O material foi mantido por 30 dias em sala de crescimento a 25 ± 2 °C e sob luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h. Avaliou-se o peso inicial (g), final (g) e peso seco (g) dos tratamentos, a partir destes valores foi calculado o rendimento real de biomassa (RRB) que é a razão entre o peso final e inicial. Para a determinação do peso seco o material vegetal foi mantido em estufa de circulação de ar por 48 horas a 65°C.



Figura 2. Modelo do Biorreator de Imersão Temporária patenteado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utilizado nos experimentos de multiplicação em biorreator.

### 3.2.5 Enraizamento das plântulas

Para o enraizamento foram testados quatro tratamentos todos com meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) líquido e com pH corrigido para 5,8 antes da autoclavagem. Os tratamentos foram:

T1: Meio de cultura MS com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose

T2: Meio de cultura MS meia força acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose

T3: Meio de cultura MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido 3-indolbutírico)

T4: Meio de cultura MS com 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose

Cada tratamento apresentou 5 repetições com 10 explantes por parcela. Os explantes eram provenientes da cultura de meristemas e estavam no quinto subcultivo. O material foi mantido em sala de crescimento a 25 ± 2 °C e sob luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h. Após 21 dias foi avaliado o comprimento da maior raiz (cm), os pesos seco (g) e fresco (g) das raízes. Para a determinação do peso seco o material vegetal foi mantido em estufa de circulação de ar por 48 horas a 65°C.

### 3.2.6 Aclimatização das plantas

Para a aclimatização das plantas foi utilizado substrato Plantmax® esterilizado em autoclave por 50 minutos com pressão de 21 atm. Utilizou-se copos plásticos de 200 ml com 4 furos no fundo de cada copo, estes ficaram em bandeja com água durante todo o experimento, cada copo continha uma planta. As plantas eram provenientes do cultivo de meristemas e estavam no quinto subcultivo. Foram testados os seguintes tratamentos:

T1: copos plásticos cobertos com sacos plásticos cortado nas pontas superiores (Figura 3) e mantidos em sala de crescimento

T2: copos plásticos cobertos com sacos plásticos cortado nas pontas superiores (Figura 3) e mantidos em casa de vegetação

T3: copos plásticos mantidos em casa de vegetação

T4: copos plásticos mantidos em sala de crescimento

Os tratamentos 1 e 4 foram mantidos em sala de crescimento a  $25 \pm 2$  °C e sob luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo de fótons de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h. Após 15 dias da instalação do experimento os sacos plásticos foram retirados dos tratamentos 1 e 2. Cada tratamento era composto por 5 repetições e 6 plantas em cada repetição. Após 30 dias da instalação do experimento foi avaliada a taxa de sobrevivência das plantas.



Figura 3. Copos plásticos, contendo uma planta de cana-de-açúcar, cultivar RB966928, com substrato plantmax<sup>®</sup> cobertos com sacos plásticos cortados nas pontas superiores, modelo utilizado nos tratamentos 1 e 2 da aclimatização. Barra: 1 cm.

### 3.2.7 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett e analisados pela análise de variância, quando homogêneas, as médias dos experimentos foram avaliadas pelo teste de Tukey. Utilizou-se o programa estatístico Assistat 7.7 beta.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Meio de cultura para indução de brotação dos meristemas

O uso de meio de cultura MS suplementado com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN e  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP aumentou consideravelmente a porcentagem de meristemas brotados (80%) quando comparado ao uso do meio de cultura MS sem suplementação de reguladores vegetais (10%). O teste qui quadrado mostrou que há diferença estatística entre os tratamentos ao nível de 1%, que pode ser observado na Figura 4.

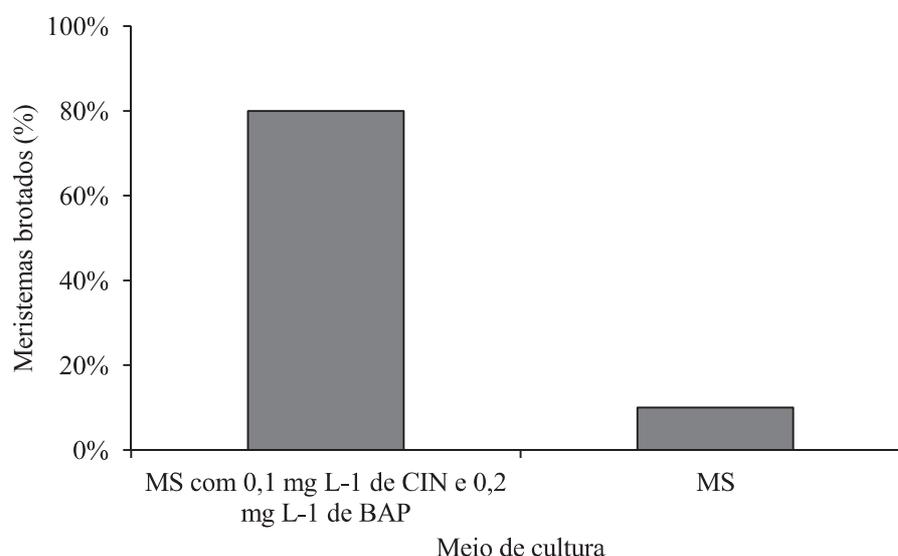


Figura 4. Porcentagem de brotações dos meristemas em função do meio de cultura utilizado para a cultivar de cana-de-açúcar RB966928 após 21 dias de cultivo. Teste qui-quadrado significância  $\chi^2=9,89^{**}$ .

O crescimento e a morfogênese de tecidos *in vitro* são regulados pela interação e o balanço entre reguladores vegetais adicionados ao meio e os fitohormônios produzidos de forma endógena nas células (AIRES et al., 2008). A adição de reguladores vegetais ao meio de cultura estimula respostas como o alongamento ou multiplicação da parte aérea. O seu principal objetivo é suprir as possíveis deficiências endógenas de fitohormônios dos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Deste modo, a adição de citocininas foi favorável para a brotação dos meristemas da cultivar RB966928 de cana-de-açúcar, isto fica evidente quando observamos o tratamento sem adição de citocininas que teve uma baixa taxa de brotação.

Vieira et al. (2009) verificaram que as concentrações de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN e  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN foram as mais adequadas para

a cultura de meristemas apicais de cana-de-açúcar da variedade RB857515. Biradar et al. (2009) trabalharam com meristemas da variedade de cana-de-açúcar CoC-671 e constataram que concentrações de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP influenciaram positivamente na regeneração dos meristemas. Ali (2008) observou que concentrações de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP;  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de cinetina mostraram a melhor resposta dos meristemas apicais da cultivares CP 77,400 e BL-4 respectivamente. Estes resultados sugerem que a concentração ideal a ser utilizada de reguladores vegetais varia com o genótipo.

Um dos fatores que pode ter influenciado negativamente na brotação dos explantes foi a oxidação, observada no tratamento com adição de citocininas (10%) e no tratamento sem adição de reguladores (30%). As Figuras 5B e 5C mostram meristemas que iniciaram o crescimento e posteriormente ficaram completamente oxidados. A oxidação se dá pela liberação de compostos fenólicos, que possuem função sinalizadora no metabolismo de defesa celular, porém quando em excesso são oxidados pelas enzimas polifenases produzindo substâncias tóxicas que inibem o crescimento dos explantes, além de escurecer o material vegetal e o meio de cultura (SATO et al., 2001; KHAN e KHATRI, 2006; LIMA, 2010).

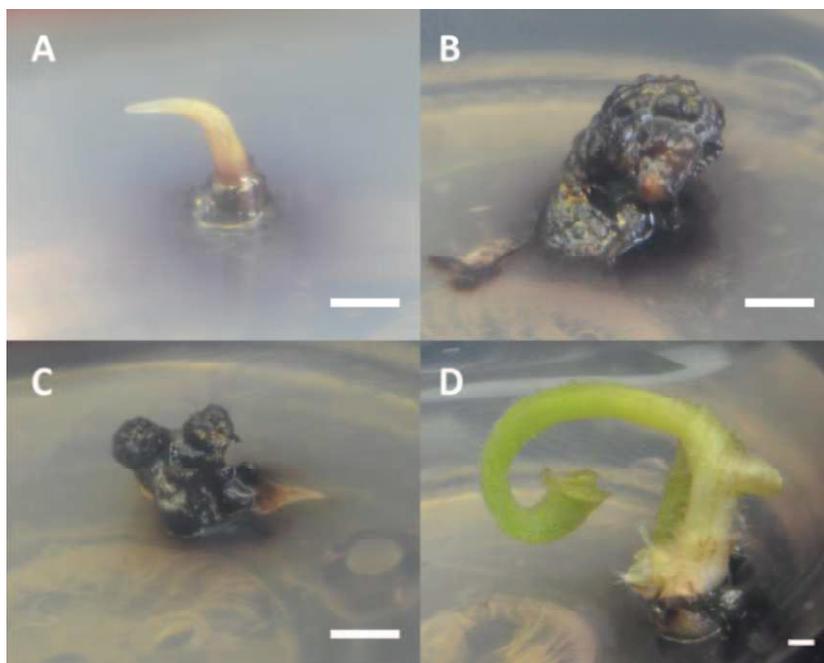


Figura 5. Fases da brotação de meristemas da cultivar RB966928 de cana-de-açúcar. Início da regeneração (A), meristemas oxidados (B) e (C), meristema regenerado (D). Meio de cultura MS acrescido de 0,1 de CIN e 0,2 de BAP. Barra: 1 mm.

### 3.3.2 Multiplicação das brotações

O aumento crescente nas concentrações de BAP promoveu uma redução no comprimento da parte aérea dos explantes formando uma regressão linear negativa (Figura 6A). As concentrações  $0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  proporcionaram as maiores médias de comprimento das brotações (14,88 cm e 12,63 cm). Para o teste Tukey ( $p < 0,01$ ) as concentrações de  $0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  não diferiram estatisticamente entre si, porém a concentração de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  foi semelhante a de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , e a de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  semelhante a de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  para o comprimento de parte aérea.

Em relação ao número de raízes a concentração de  $0 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 6B) foi a que mais respondeu com um número médio de 7,80 raízes por explante, possivelmente pela ausência de BAP no meio de cultura que pode ter levado a um desbalanço hormonal interno entre auxina e citocinina. Taiz e Zeiger (2009) ressaltaram que a alta razão entre auxina/citocinina estimula a formação de raízes. Resultados semelhantes foram encontrados para a *Pfaffia glomerata* (FLORES, et al. 2009) e amoreira-preta 'Ébano' (VILLA et al., 2005). A concentração de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  diferiu estatisticamente das demais e apresentou um valor médio de 3 raízes por explante. Já as duas concentrações restantes ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) não apresentaram diferença estatística, pelo teste Tukey ( $p < 0,01$ ), e o número médio de raízes por explante foi 0,2. Para o número de raízes a análise de regressão apresentou uma curva quadrática.

Na variável brotações adventícias, foi possível notar que há uma elevação contínua no número de brotações, chegando ao máximo (6,70 brotações por explante) na concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  seguido de um decréscimo na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  (6,03 brotações por explante), formando uma regressão quadrática (Figura 6C). O número crescente de brotações é justificado pelo uso de citocininas, uma vez que este regulador é responsável pela quebra da dominância apical aumentando o número de brotações laterais (VIEIRA et al., 2009).

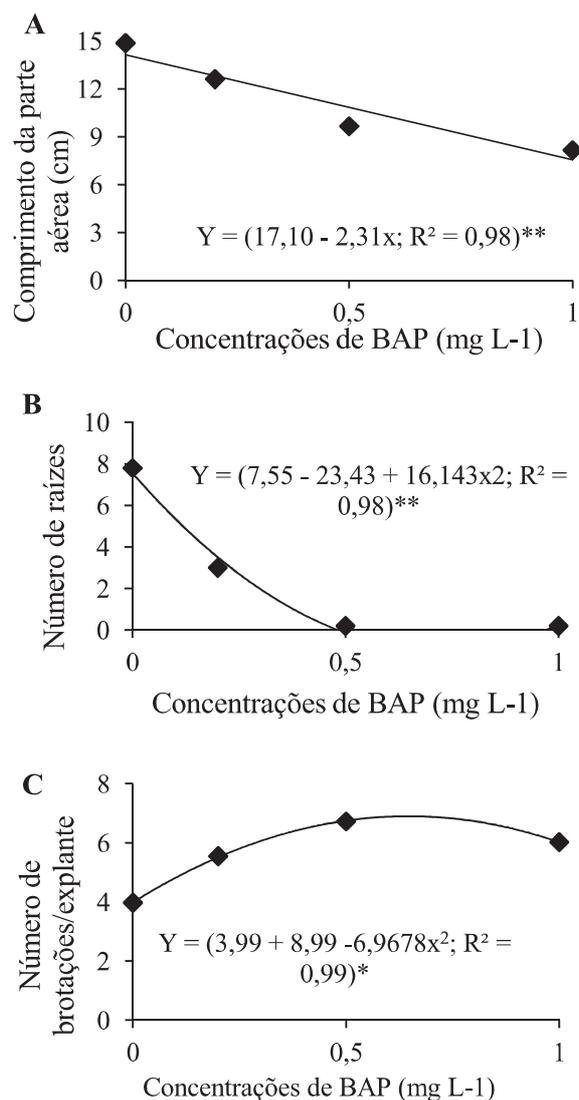


Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de BAP na multiplicação de brotações de cana-de-açúcar cultivar RB966928. A) Comprimento médio das brotações (cm), B) número médio de raízes, C) brotações por explante.

Por outro lado, o número elevado de brotações não representa o melhor tratamento pois, apesar do número elevado de brotações, estas não apresentaram crescimento da parte aérea desejável (Figura 7), uma vez que o excesso de citocininas pode ser danoso para o explante, caracterizando-se pela redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós e engrossamento exagerado dos caules (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Apesar do efeito danoso causado pelas concentrações 0,5 mg L<sup>-1</sup> e 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP para a cultivar estudada, para outras cultivares concentrações mais altas são recomendadas, como observaram Crispim et al. (2014), que recomendam as concentrações de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de CIN para a multiplicação da

variedade POJ Branca. Ali et al. (2008) também recomendam  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP para a cultivar CP 77400.

A concentração de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP não proporcionou a maior média de brotações, porém não diferiu estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), das concentrações superiores. Além disto, proporcionou um comprimento satisfatório das brotações e um número pequeno de raízes. Por isto é a concentração de BAP recomendada para a multiplicação da cultivar RB966928.

O uso de concentrações próximas foram descritas por Vieira et al. (2009) que recomendam o uso de  $0,1$  ou  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP para aumentar o ganho de massa fresca em brotações da cultivar RB855156 de cana-de-açúcar. E Ali et al. (2008) recomendam concentrações inferiores de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN para a cultivar BL-4.

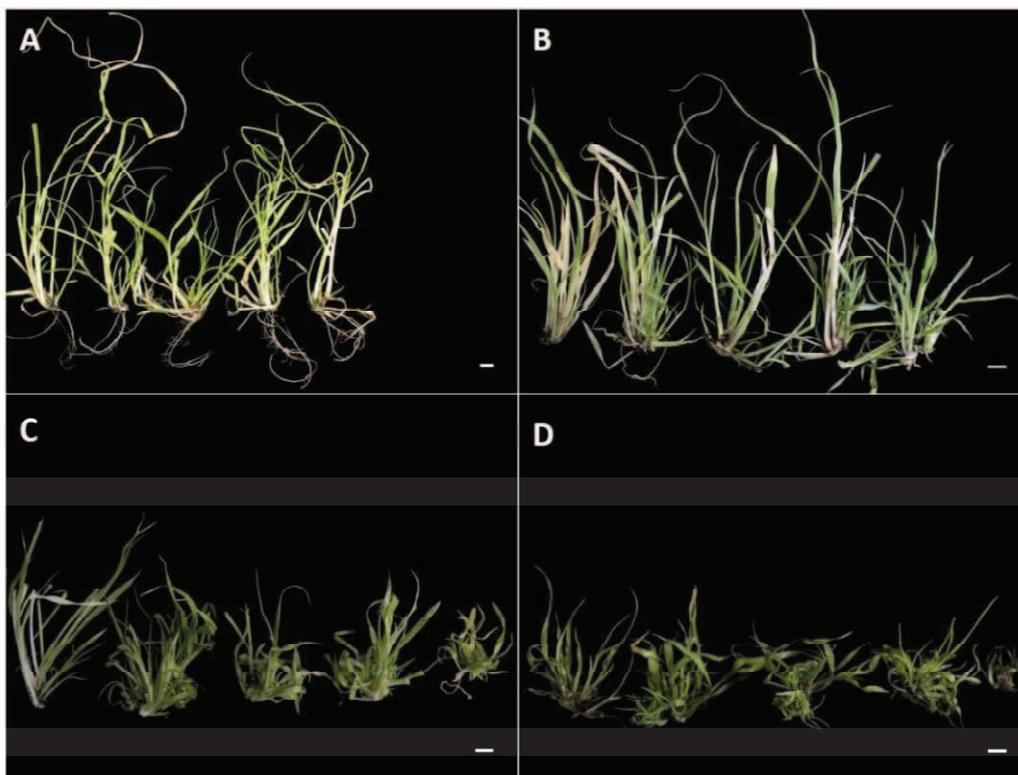


Figura 7. Fase de multiplicação das brotações da cultivar RB966928 de cana-de-açúcar. A) Testemunha (sem adição de reguladores), B)  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN, C)  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN, D)  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN. Tempo de cultivo: 15 dias. Barra: 1 cm.

### 3.3.3 Multiplicação em Biorreator

Os três tratamentos para a frequência de imersão não diferiram estatisticamente entre si, porém a frequência de imersão de quatro vezes ao dia foi a que apresentou o maior crescimento de biomassa com o rendimento relativo de biomassa de 14,21 vezes (Tabela 1).

Tabela 1. Peso inicial, peso final, peso seco e rendimento relativo de biomassa (RRB) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB966928 cultivadas em biorreator de imersão temporária com variação da frequência de imersão. Meio de cultura: MS acrescido de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Tempo de cultivo: 30 dias.

| Tratamento<br>(vezes por<br>dia) | Peso Inicial<br>(g) | Peso Final<br>(g) | Peso Seco<br>(g) | RRB         | Oxidação |
|----------------------------------|---------------------|-------------------|------------------|-------------|----------|
| Uma                              | 6,732 ± 0,6         | 65,18 ± 2,9       | 5,04 ± 0,1       | 9,44 ± 0,7  | +        |
| Quatro                           | 6,418 ± 0,9         | 78,17 ± 5,6       | 6,12 ± 0,6       | 14,21 ± 3,2 | ++       |
| Oito                             | 7,574 ± 0,1         | 83,13 ± 2,5       | 6,91 ± 0,0       | 11,07 ± 0,2 | +++      |

+ Pouco; ++ Médio; +++ Muito

A frequência de imersão de oito vezes ao dia foi a que possibilitou o maior contato do meio de cultura com os explantes. O contato excessivo pode ter causado a oxidação do material, uma vez que esta foi observada no meio de cultura e nos explantes. A oxidação pode inibir o crescimento das plântulas podendo levar a morte devido aos compostos tóxicos produzidos (SATO et al., 2001). Diferente disto a frequência de uma vez ao dia apresentou pouca oxidação, mas também teve um rendimento relativo de biomassa reduzido, isto pode ser explicado pelo pouco contato do meio com o material, já que a frequência de imersão é que determina a absorção de nutrientes e controla a hiperhidricidade das plantas, na maior parte dos casos as maiores frequências de imersão favorecem o maior aproveitamento do meio de cultura pela planta (ETIENNE e BERTHOULY 2002; OLIVEIRA et al., 2014). Em nenhum dos tratamentos foi observada hiperhidricidade, fenômeno muito comum em trabalhos com biorreator.

Os tratamentos da variável tempo de imersão não apresentaram diferença estatística entre si. Os resultados do rendimento relativo de biomassa apresentaram pequena variação, sendo o tratamento com o tempo de 5 minutos de imersão responsável pelo maior valor 11,64. Os tempos de imersão testados não interferem no rendimento relativo de biomassa da cultivar estudada (Tabela 2).

Tabela 2. Peso inicial, peso final, peso seco e rendimento relativo de biomassa (RRB) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB966928 cultivadas em biorreator de imersão temporária com variação no tempo de imersão. Meio de cultura: MS acrescido de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Tempo de cultivo: 30 dias.

| Tratamento (min) | Peso Inicial (g) | Peso Final (g) | Peso Seco (g) | RRB         |
|------------------|------------------|----------------|---------------|-------------|
| 5                | 9,91 ± 0,7       | 115,12 ± 12,6  | 15,35 ± 1,5   | 11,64 ± 1,6 |
| 10               | 11,39 ± 0,3      | 122,78 ± 4,1   | 17,39 ± 0,5   | 10,78 ± 0,2 |
| 25               | 10,81 ± 0,3      | 121,63 ± 2,8   | 17,48 ± 0,3   | 11,16 ± 0,4 |

Lorenzo et al. (2001) compararam a propagação de cana-de-açúcar cultivar C1051-73 no cultivo *in vitro* convencional, cultivo em biorreator de imersão temporária (utilizando frequência de imersão de oito vezes ao dia e o tempo de imersão de 2 minutos) e macropropagação e concluiu que as plantas dos três sistemas de propagação não diferiram entre si após o nono mês de cultivo no campo. Em outras culturas como o *Eucalyptus* quando comparado às frequências de imersão, no sistema RITA<sup>®</sup> (Recipiente de Imersão Temporária Automática), de 12, 6, 3 e 2 vezes ao dia, as frequências de 12 e 6 vezes ao dia e tempo de imersão de 8 segundos proporcionaram maior crescimento em massa fresca e número de brotos formados por explante, porém ocasionaram maior tendência ao aparecimento da hiper-hidricidade (OLIVEIRA et al., 2014). Em abacaxi foram comparadas as frequências de imersão de 12, 4 e 8 vezes ao dia com tempo de imersão de 3 minutos, as maiores taxas de altura, matéria seca e brotos foi encontrada trabalhando com 12 vezes ao dia (SILVA et al., 2007). Estes estudos mostram que a determinação do melhor tempo de imersão e frequência variam com o genótipo do material trabalhado.

### 3.3.4 Enraizamento

Os resultados para o comprimento da maior raiz da cultivar estudada apresentaram diferenças estatísticas entre si, sendo que o tratamento 4 (meio MS com adição de 70 g L<sup>-1</sup>) apresentou a maior média de comprimento com 8,12 cm. Na sequência de maior comprimento ficou o tratamento 3 (meio MS com adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB) com 5,86 cm e o 2 (meio MS/2 com adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose) com 5,22 cm, estes não diferiram estatisticamente entre si. O primeiro (meio MS com adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose) com 3,26 cm, foi semelhante estatisticamente aos tratamentos 2 e 3. (Figura 8).

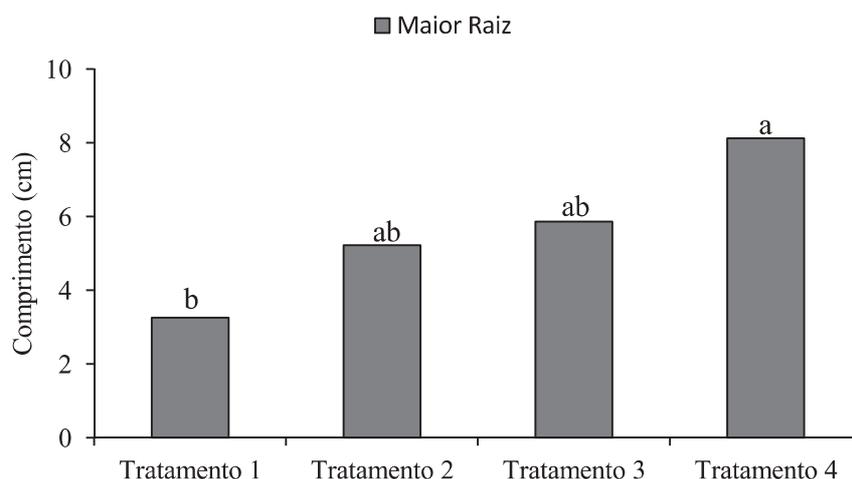


Figura 8. Comprimento da maior raiz em função dos meios de cultura para enraizamento de cana-de-açúcar cultivar RB966928 com 21 dias de cultivo. Tratamento 1: Testemunha (meio MS); Tratamento 2: MS/2 com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; Tratamento 3: 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB; Tratamento 4: 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey  $p < 0,01$ .

Os valores de peso fresco e seco das raízes seguiram a mesma tendência do comprimento da maior raiz, com o tratamento 4 com os maiores valores (2,09 g e 0,2 g respectivamente) e diferindo estatisticamente dos demais (Figura 9). Estes resultados também são visíveis na Figura 10, pode-se perceber que o tratamento 4 apresentou uma maior presença de raízes (Figura 10D), seguido pelos tratamentos 3 (Figura 10C), 2 (Figura 10B) e 1 (Figura 10A).

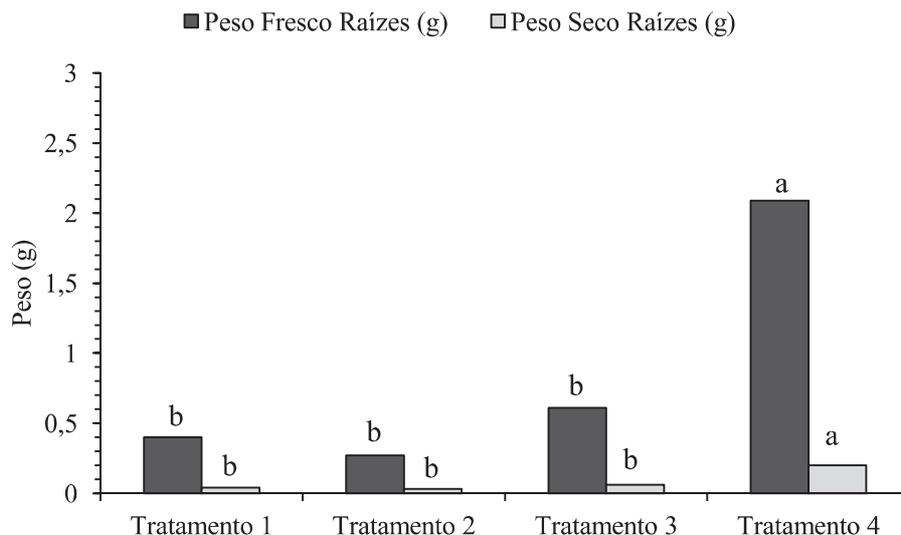


Figura 9. Peso fresco e seco das raízes em função dos meios de cultura para enraizamento de cana-de-açúcar cultivar RB966928 com 21 dias de cultivo. Tratamento 1: Testemunha (meio MS); Tratamento 2: 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; Tratamento 3: 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido 3-indolbutírico); Tratamento 4: 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Médias seguidas pela mesma letra em cada variável não diferem entre si pelo teste Tukey  $p < 0,01$ .

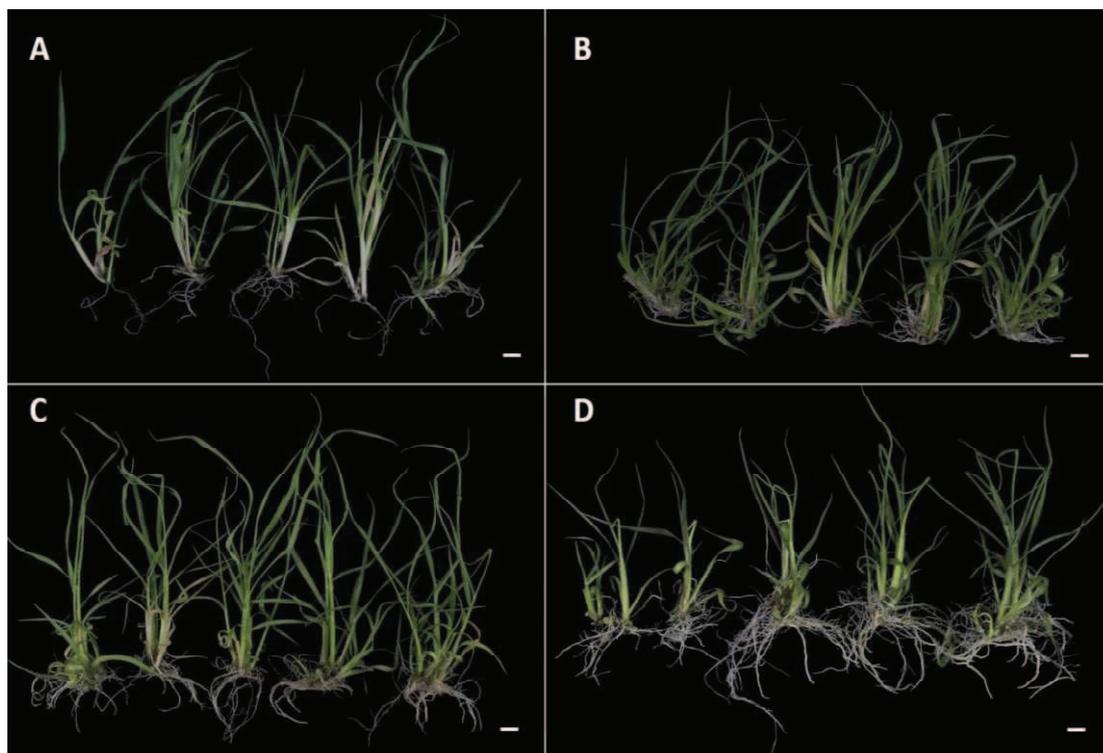


Figura 10. Enraizamento da cultivar RB966928 de cana-de-açúcar em função de diferentes meios de cultura para enraizamento, plantas com 21 dias de cultivo. A) Testemunha (meio MS); B) MS/2 com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; C) 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido 3-indolbutírico); D) 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Barra: 1 cm.

O enraizamento de espécies herbáceas é relativamente fácil, comumente se utiliza meio de cultura com a concentração de sais reduzida, uma vez que estes podem inibir todas as fases do enraizamento. Para estas espécies a concentração de auxina dever ser baixa ou ausente, já que o rápido crescimento da parte aérea é uma fonte intensa de produção de auxina, que translocada para a base estimula a rizogênese (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Apesar disto, resultado oposto foi observado neste trabalho. Nos tratamentos 1 e 2 o baixo enraizamento pode ter ocorrido pela falta de uma fonte externa de auxina e um incremento na fonte de carboidratos. Possivelmente o balanço interno dos hormônios auxina/citocinina estava baixo, as fases iniciais da rizogênese (indução e iniciação) respondem ou dependem de auxina. Outra possibilidade é o efeito residual da citocinina, uma vez que os explantes eram provenientes da fase de multiplicação. Provavelmente se o material ficasse incubado por mais tempo nos meios de cultura estudados o efeito residual poderia ter sido reduzido.

O uso de uma fonte externa de auxina é empregado para o enraizamento de algumas cultivares da cana. Nogueira (2013) obteve sucesso no enraizamento utilizando meio MS contendo metade de suas concentrações salinas e suplementado com  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB para as cultivares RB845210, SP78-4764, SP70-1143, RB83160, VAT90-212 e SP71-6949. Lima (2010) concluiu que para a indução de enraizamento da cultivar RB92579 a dosagem de  $3,0 \text{ } \mu\text{M}$  de AIB e a concentração de  $1,5 \text{ } \mu\text{M}$  de AIA para a RB872552 são as mais recomendadas. Apesar dos bons resultados para outras cultivares, a adição de  $70 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose foi mais satisfatória para o enraizamento do que o uso de AIB para a cultivar estudada.

Alguns trabalhos relatam a importância da sacarose no enraizamento, para a formação de raízes existe a necessidade de energia e carboidratos, que na micropropagação são oriundos de fonte externa. O carbono exógeno no meio serve como fonte de energia influenciando na fisiologia da planta, diferenciação, indução e formação de órgãos (MOTHÉ et al., 2008; CALVETE et al., 2012). Singh (2003) obteve resposta significativa para a combinação meio MS suplementado com  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB e  $70 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose no enraizamento da cultivar CoJ-85. Khan (2006) recomenda o uso de 6% de açúcar comercial mais  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB adicionados ao meio MS para o enraizamento *in vitro* do clone AEC82-223. Por outro lado o uso de concentrações elevadas de sacarose no enraizamento pode ser prejudicial para o condicionamento das plantas ao estado fotoautotrófico durante a aclimatização.

### 3.3.5 Aclimatização

A análise estatística da sobrevivência das plantas não mostrou diferença entre os tratamentos avaliados. Os tratamentos 1 e 2 (cobertos com saco plástico) atingiram uma média de 100% de sobrevivência, já os tratamentos 3 e 4 (sem a cobertura do saco plástico) apresentaram médias de sobrevivência de 93% e 89% respectivamente (Figura 11).

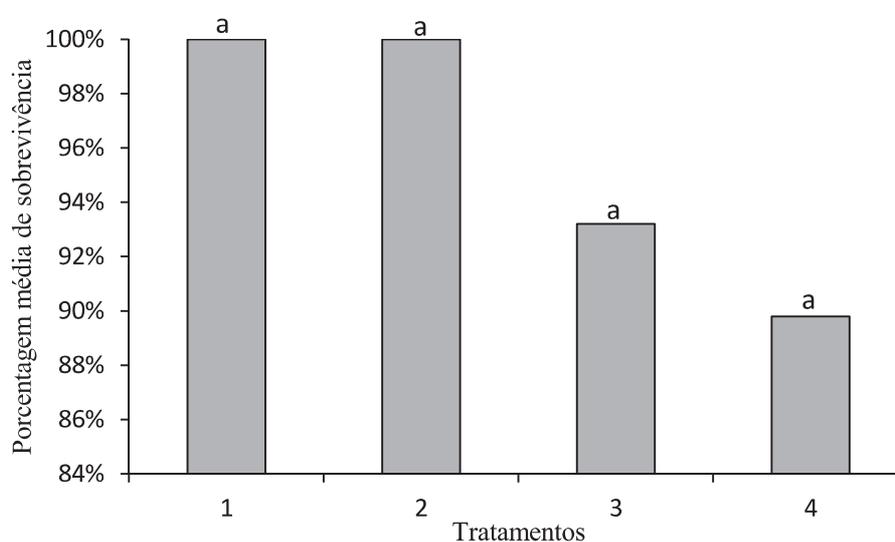


Figura 11. Porcentagem média de sobrevivência de plantas acclimatizadas de cana-de-açúcar cultivar RB966928, cultivadas por 30 dias em substrato Plantmax<sup>®</sup>. Tratamento 1: plantas cobertas com sacos plásticos e mantidas em sala de crescimento. Tratamento 2: plantas cobertas com sacos plásticos e mantidas em casa de vegetação. Tratamento 3: plantas sem cobertura e mantidas em casa de vegetação. Tratamento 4: plantas sem cobertura e mantidas em sala de crescimento.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey  $p \geq 0,05$ .

A aclimatização é uma fase crítica para as plantas provenientes da micropropagação, uma vez que estas necessitam se adaptar a um novo ambiente. Esta passagem é algumas vezes um fator limitante para o cultivo *in vitro*, isto porque as plantas precisam se adaptar a um ambiente onde a umidade relativa é mais baixa, a disponibilidade de nutrientes é menor e pode haver ataques de microrganismos, além disso, elas precisam passar do estado heterotrófico para o autotrófico (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O microambiente formado nos tratamentos cobertos com saco plástico (tratamentos 1 e 2) favoreceu a sobrevivência das plantas, possivelmente por aumentar a umidade relativa. O tratamento 4, mantido em sala de crescimento, foi o que apresentou a menor taxa de sobrevivência. O uso de ar condicionado para manter a temperatura da sala de crescimento reduz a umidade relativa do ar, o que pode ter prejudicado a aclimatização destas plantas (Figura 12).



Figura 12. Aclimatização de plantas de cana-de-açúcar cultivar RB966928 cultivadas por 30 dias em substrato Plantmax<sup>®</sup>. 1) plantas mantidas com saco plástico e acondicionadas em sala de crescimento, 2) plantas mantidas com saco plástico e acondicionadas em casa de vegetação, 3) plantas mantidas sem saco plástico e acondicionadas em casa de vegetação, 4) planta sem saco plástico e mantidas em sala de crescimento. Barra 1 cm.

Alcantara et al. (2014b) aclimatizaram plantas de cana-de-açúcar cultivares RB855156 e RB72454 utilizando copos plásticos com Plantmax<sup>®</sup> e cobertura de sacos de plástico e obtiveram 100% de sobrevivência. Já Dibax et al. (2011) utilizaram

bandejas de polietileno para distribuir as mudas e vermiculita com solução de sais do meio MS como substrato e obtiveram 85% de taxa de sobrevivência para a cultivar RB931003 e 100% para a cultivar RB98710. Barboza et al. (2007) tiveram sucesso na aclimatização transferindo as mudas de cana cultivar RB925268 para vasos de plástico mantendo-os em casa de vegetação.

Os tratamentos 1 e 2 apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência, porém o tratamento 3 obteve mais de 90% de plantas aclimatizadas. A utilização do tratamento 3 para a produção em larga escala pode ser mais prático, uma vez que os copos plásticos podem ser substituídos por tubetes e não há necessidade do uso da cobertura plástica, acelerando e facilitando a produção de mudas.

### 3.4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que:

A presença de citocininas é fundamental na brotação de meristemas.

O uso da concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de CIN e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP são as adequadas para a multiplicação das brotações.

O biorreator de imersão temporária é eficiente para a multiplicação das brotações utilizando a frequência de imersão de 4 vezes ao dia e o tempo de imersão de 5 minutos.

O meio de cultura com de 70 g L<sup>-1</sup> de sacarose é o mais indicado para o enraizamento da cultivar.

A aclimatização sem a cobertura do saco plástico e as plantas mantidas em casa de vegetação pode ser utilizada sem grandes prejuízos.

### 3.5 REFERÊNCIAS

AIRES, P. S. R.; CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W. SILVA, H. Efeito da citocinina 6-bencilaminopurina na micropropagação *in vitro* da mamona utilizando o genótipo BRS nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 8, n. 2, p. 80-83, 2008.

ALCANTARA, G. B.; MACHADO, M. P.; RIBEIRO, D. S.; WIPPEL, H. H.; FILHO, J. C. B.; OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E. Multiplicação, alongamento e enraizamento de

brotações *in vitro* declones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 5, N.1: p. 20-25, Fev. 2014a.

ALCANTARA, G. B. DE; DIBAX, R.; OLIVEIRA, R. A. DE; FILHO, J. C. B.; DAROS, E.. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane ( *Saccharum* spp .) cultivars RB855156 and RB72454. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 36, n. 1, p. 63-72, Jan.-Mar., 2014b.

ALI, A.; NAZ, S.; SIDDIQUI, F. A.; IQBAL, J. An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 139–149, 2008.

BIRADAR, S.; BIRADAR, D. P.; PATIL, V. C.; PATIL, S. S.; KAMBAR, N. S. In vitro plant regeneration using shoot tip culture in commercial cultivar of sugarcane. **Karnataka Journal Agriculture Science**, v. 22, n. 1, p. 24–27, 2009.

CALVETE, E. O.; KAMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura brasileira**, v. 20, n. 2, p. 186–191, 2002.

CRISPIM, J. G.; MONTEIRO, M.; RÊGO, D.; et al. Efeito do benzilaminopurina e da cinetina sobre potencial morfogênico de cana-de-açúcar. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 35, p. 94–99, 2014.

DIBAX, R.; ALCANTARA, G. B.; BESPALHOK FILHO, J. C.; et al. Plant regeneration of sugarcane cv. RB931003 and RB98710 from somatic embryos and acclimatization. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. August, p. 32–37, 2011.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 215–231, 2002.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. . Benzilaminopurina ( BAP ) e thidiazuron ( TDZ ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* ( Spreng .) Pedersen. **Revista Brasileira Plantas Medicinai.**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 292–299, 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa – CNPH, 1998. p. 183-260.

KHAN, I. A.; KHATRI, A. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: Histological studies. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 3, p. 631–636, 2006.

LEMO, E. E. P. Micropropagação da cana-de-açúcar. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. SILVA. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 279-308.

LIMA, G. V. M. **Ação de auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2010. 96 f. Dissertação

(Mestrado em Agronomia) – Botânica. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2010.

LORENZO, J. C.; OJEDA, E.; ESPINOSA, A.; BORROTO, C. Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 6, p. 803–806, 2001.

MOTHÉ, G. P. B.; NETTO, A. T.; CRESPO, L. E. C.; CAMPOSTRINI, E. Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e qualidade de luz. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.4, n.2, p. 84-91, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum** 15:473-479, 1962.

NOGUEIRA, G. F. **Regeneração, conservação in vitro e estabilidade genômica em cana-de-açúcar**. 2013. 195 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013

OLIVEIRA, M. L. DE; XAVIER, A.; FILHO, R. M. P.; REIS, J. P. DOS. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 37–45, 2014.

RIDESA. Catálogo Nacional de Variedades “RB” de cana-de-açúcar. **Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro**. – Curitiba, 2010.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.; et al. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cernea**, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; DE ARAÚJO, A. G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 9, p. 1257–1260, 2007.

SINGH, R. **Tissue culture studies of sugarcane**. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Thapar Institute of Engineering and Technology. Patiala, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002. 690 p.

VIEIRA, R. A.; SILVA, C. M.; 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 RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v.4, n.1, p. 122-126, jan/dez. 2009.

VILLA, F.; ARAÚJO, A. G. DE; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação in vitro da amoreira-preta “ÉBANO” em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 582–589, 2005.

#### **4. CAPÍTULO II: CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO ENRAIZAMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVAR RB966928 *IN VITRO***

##### RESUMO

A micropropagação é uma grande aliada da cultura de cana-de-açúcar, já que a partir dela é possível obter mudas de alta qualidade fitossanitária em tempo e espaço reduzidos. Para obter mudas de qualidade a partir da cultura de tecidos são necessários alguns cuidados, como ajustar o meio de cultura para suprir de forma eficiente às necessidades das plântulas. O uso de uma fonte externa de carboidratos no meio de cultura é fundamental para a micropropagação, uma vez que as plântulas não são capazes de realizar fotossíntese. O ajuste de carboidratos na fase de enraizamento é de grande importância, já que nesta etapa as plântulas precisam de energia para o desenvolvimento das raízes adventícias. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito das concentrações de sacarose no meio de cultura de enraizamento e avaliar as características de crescimento da cana-de-açúcar cultivar RB966928 *in vitro*. Foram realizados cinco tratamentos com as seguintes concentrações de sacarose 0, 20, 40, 60 e 80 g L<sup>-1</sup> em meio MS, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento e 10 explantes por repetição. Após 15 dias, avaliou-se o comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes, peso fresco e seco. O aumento crescente nas concentrações de sacarose elevou o comprimento da parte aérea, raízes, número de raízes, peso seco e fresco. Apesar do incremento na parte aérea e raízes foi possível perceber um decréscimo nas variáveis na concentração de 80 g L<sup>-1</sup>. A cultivar estudada mostrou-se dependente de sacarose para o enraizamento, a concentração de 60 g L<sup>-1</sup> foi a que apresentou os melhores resultados para as variáveis avaliadas.

Palavras chaves: micropropagação, *Saccharum* spp., carboidratos, açúcar.

## CHAPTER II: CONCENTRATION OF SUCROSE IN ROOTING OF SUGARCANE CULTIVAR RB966928 *IN VITRO*

### ABSTRACT

The micropropagation is a great ally of the sugarcane crop, since from it is possible to obtain high quality plant seedlings in reduced time and space. For quality seedlings from tissue culture some care are necessary, such as adjusting the culture media to meet efficiently the seedling needs. The use of an external source of carbohydrates in the culture media is essential for micropropagation, once the seedlings are not capable to perform photosynthesis. So the objective of this work was to verify the effect of the sucrose concentration in the culture media and evaluate the growth characteristics of sugarcane cultivar RB966928 *in vitro*. There were five treatments with the sucrose doses of 0, 20, 40, 60 and 80 g L<sup>-1</sup> with culture media MS, the experimental design was completely randomized with five replicates per treatment and 10 explants per repetition. It was evaluated the shoot length, the longest root length, number of roots, dry and fresh weight. Seedlings response were dependent on sucrose, since the treatment without this did not show satisfactory growth. The increase in sucrose doses increased the length of shoots, roots, number of roots, dry and fresh weight. Despite the increase in shoot and root was possible to see a decrease in the variables at a dose of 80 g L<sup>-1</sup>. The dose of 60 g L<sup>-1</sup> showed the best results for variables evaluated.

**Keywords:** micropropagation, *Saccharum* spp, carbohydrates, sugar.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar foi trazida pelos portugueses para o Brasil em meados do século XVI com o objetivo de romper o monopólio da produção de açúcar exercido pelo Oriente Médio e estimular o crescimento econômico do país (BRAIBANTE et al., 2013). Desde então a cultura passou a ter um importante papel na economia brasileira.

Atualmente o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e açúcar no mundo. O país possui fatores favoráveis para o estabelecimento da cultura como o clima tropical e programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares elite. Aliado a estes dois fatores está a qualidade das mudas utilizadas para o plantio.

O uso de mudas de qualidade é uma etapa importante no estabelecimento da cultura. Com o uso de mudas sadias é possível elevar a sanidade, o vigor, diminuir perdas de material e garantir a uniformidade da cultura. Para garantir a sanidade das mudas e a produção em larga escala é utilizada a micropropagação de plantas.

A micropropagação utiliza basicamente meios de cultura com sais minerais, macro e micronutrientes, vitaminas e uma fonte de carboidratos (comumente utiliza-se a sacarose). A sacarose por sua vez tem um papel fundamental na regeneração das plantas, já que ela é responsável por dar energia aos explantes, uma vez que plantas cultivadas *in vitro* vivem em condições heterotróficas e necessitam de uma fonte de carbono externa para sobreviver.

Grattapaglia e Machado (1998) relatam que as concentrações de 2 a 3% (p/v) na fase de multiplicação e crescimento são as mais comuns. Concentrações inferiores podem levar a ocorrência de clorose e acima podem incorrer com problemas de excessivo potencial osmótico, possibilitando a deterioração das culturas.

O aumento das concentrações de sacarose para o enraizamento é uma prática utilizada em algumas culturas *in vitro* como morangueiro (CALVETE et al., 2002), ginseng brasileiro (NICOLOSO et al., 2003), mamoeiro (SCHMILDT et al., 2007) e orquídea *Oncidium baueri* (SORACE et al., 2008). Na cana-de-açúcar alguns autores evidenciaram a importância de aumentar os níveis de sacarose no enraizamento como Khan et al. (2006) que adicionaram ao meio de cultura 6% de sacarose e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de IBA, Shing et al. (2001) também utilizaram, 6% de sacarose e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de NAA e Mothé et al. (2008) constataram que o aumento de sacarose levou a aumentos na matéria seca da parte aérea e da raiz, na massa foliar específica e na intensidade de cor verde das folhas estudadas.

Por outro lado, alguns autores defendem que na fase de enraizamento as concentrações de sacarose devem ser reduzidas, para diminuir o estresse sofrido pela planta durante a fase de aclimatização. A redução nas concentrações de sacarose tem o objetivo de habituar as plantas à fotossíntese e adaptá-las à nutrição autotrófica (LEITE et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura e avaliar as características de enraizamento da cana-de-açúcar cultivar RB966928 *in vitro*.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

Mini toletes de cana-de-açúcar cultivar RB966928, cedidos pela RIDESA unidade de Paranavaí – PR, foram plantados em bandejas plásticas. Após a emergência das plantas e com comprimento médio de 15 cm, palmitos com aproximadamente 5 cm foram retirados. Em câmara de fluxo o material foi desinfestado com álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos e enxaguados três vezes com água deionizada esterilizada. Com o auxílio de um estereoscópio os meristemas foram isolados e acondicionados em meio de cultura para multiplicação. Depois de brotados os meristemas foram transferidos para o meio de cultura de multiplicação e então subcultivados a cada 15 dias.

Plântulas no sexto subcultivo foram submetidas a diferentes concentrações de sacarose. As concentrações de 0 g L<sup>-1</sup>; 20 g L<sup>-1</sup>; 40 g L<sup>-1</sup>; 60 g L<sup>-1</sup>; 80 g L<sup>-1</sup> de sacarose foram acrescidas ao meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), que antes de autoclavado teve seu pH corrigido para 5,8. Foram utilizados frascos de 200 ml com 35 ml de meio de cultura. Os explantes iniciais eram formados por uma plântula com três brotações conforme a Figura 1. O material foi mantido em sala de crescimento a 25 ± 2 °C sob luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h. Após 15 dias avaliou-se o comprimento de parte aérea (cm), comprimento da maior raiz (cm), número de raízes, peso fresco (g) e seco (g). A partir

dos valores de peso fresco e seco foi calculada a porcentagem de conteúdo de água dos explantes, pela diferença do peso fresco e seco, dividido pelo peso fresco.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento e 10 explantes por repetição. Os resultados foram avaliados pela ANOVA e submetidos à análise de regressão. O programa estatístico utilizado foi o Assistat 7.7 beta.



Figura 1. Explante inicial de cana-de-açúcar cultivar RB966928, no sexto subcultivo, com três brotações, utilizado no trabalho.

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes concentrações de sacarose influenciaram diretamente na produção de biomassa de parte aérea e de raízes. O uso de concentrações crescentes aumentou a biomassa geral dos explantes. A dosagem de 0 g L<sup>-1</sup> apresentou baixo crescimento de parte aérea e ausência de raízes, alguns explantes exibiram amarelecimento chegando a morte (Figura 3A). Resultados semelhantes foram observados por Mothé et al. (2008) em cana-de-açúcar e por Rocha et al. (2013) também em cana cultivar RB872552.

Os resultados obtidos no tratamento com ausência de sacarose mostram o comportamento heterotrófico da cana *in vitro*. Assim a presença de sacarose, como uma fonte de carbono, mostrou-se fundamental para o desenvolvimento e crescimento da cultura.

Houve um aumento crescente no comprimento da parte aérea em relação ao aumento das concentrações de sacarose (Figura 2A) formando uma regressão linear positiva, porém a ANOVA não mostrou diferença estatística entre as concentrações 20 g L<sup>-1</sup>, 40 g L<sup>-1</sup>, 60 g L<sup>-1</sup> e 80 g L<sup>-1</sup>.

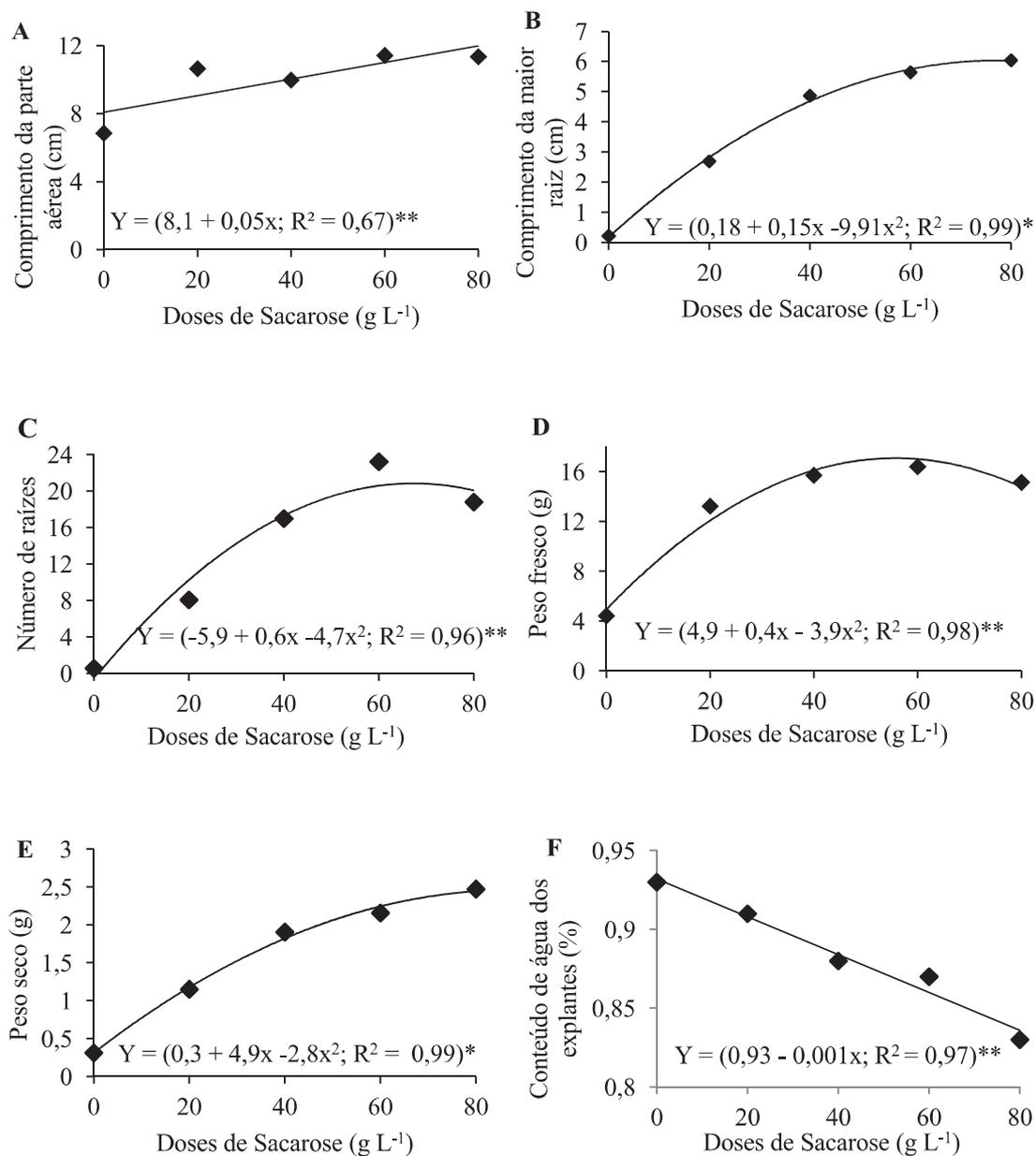


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de sacarose em cana-de-açúcar cultivar RB966928. A) Comprimento da parte aérea (cm), B) comprimento da maior raiz (cm), C) número de raízes, D) peso fresco (g), E) peso seco (g), F) porcentagem de conteúdo de água nos explantes da cultivar de cana-de-açúcar RB966928.

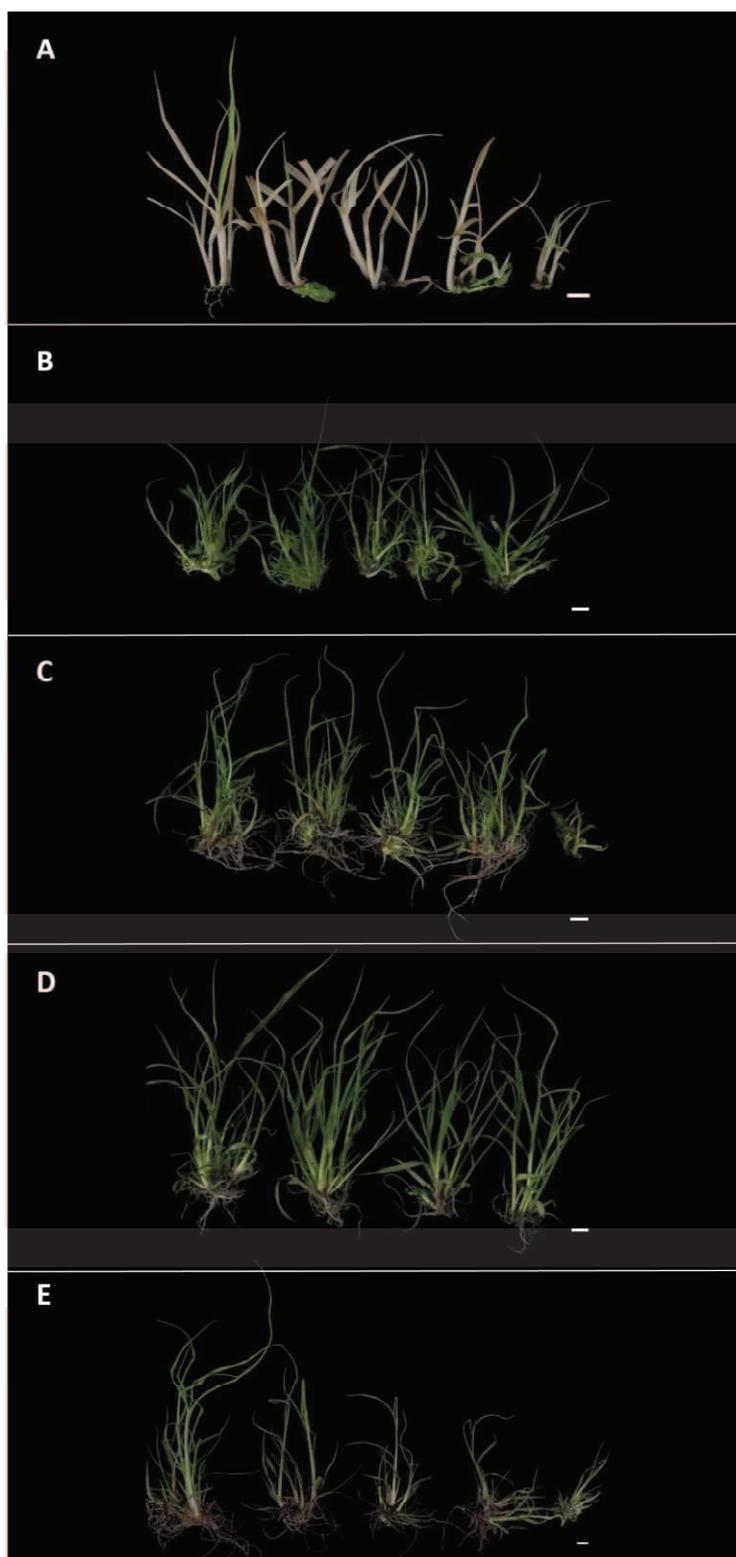


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de sacarose em cana-de-açúcar cultivar RB966928. A) Tratamento com  $0 \text{ g L}^{-1}$ , B) tratamento com  $20 \text{ g L}^{-1}$ , C) tratamento com  $40 \text{ g L}^{-1}$ , D) tratamento com  $60 \text{ g L}^{-1}$ , E) tratamento com  $80 \text{ g L}^{-1}$ . Barra: 1 cm.

Houve aumento crescente no comprimento das raízes em função do aumento das concentrações de sacarose (Figura 2B), contudo pela linha de tendência do gráfico

haverá um decréscimo no comprimento das raízes se concentrações crescentes forem utilizadas. Apesar do aumento no comprimento das raízes, a concentração de 80 g L<sup>-1</sup> diminuiu o número de raízes por explante (Figura 2C). A concentração em que se obteve o maior número de raízes foi de 60 g L<sup>-1</sup>.

Para a rizogênese é indispensável uma fonte de energia, esta pode ser proveniente da fotossíntese ou de fontes externas de açúcar (MOTHÉ et al., 2008; THORPE et al., 2008). Grattapaglia e Machado (1998) recomendam o uso de 2 a 3% (p/v) de sacarose no meio de cultura para o enraizamento. Os resultados do presente trabalho discordam desta afirmação, uma vez que houve aumento no número e no comprimento de raízes utilizando concentrações superiores a 2 e 3% (p/v).

A concentração de 80 g L<sup>-1</sup> apresentou raízes mais longas, porém Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que raízes curtas são mais desejáveis, pois facilitam a introdução da planta no substrato, além de estarem numa fase de crescimento ativo, a qual acelera o pegamento da planta e evita o enovelamento. Neste sentido a concentração de 60 g L<sup>-1</sup> é a mais viável para o enraizamento da cultivar estudada, uma vez que apresentou raízes mais curtas e em maior número. Resultados semelhantes para a dosagem de sacarose foram descritos por Khan et al., que constataram que meio de cultura MS com adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de IBA e 6% de sacarose foi o mais adequado para o enraizamento, além de ressaltarem a importância do aumento no nível de sacarose de 4% na multiplicação para 6% no enraizamento para a cana-de-açúcar cultivares NIA-98, NIA-2004, BL4, AEC82-223 e Thatta-10. Shing et al. (2001) também utilizaram 6% de sacarose e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de NAA para enraizamento das cultivares Co 89003, CoJ 83, CoJ 85, CoJ 86, CoS95255.

O aumento no enraizamento em função do aumento das concentrações de sacarose também foi observado em outras culturas como no morangueiro cultivar Campinas e no ginseng brasileiro (CALVETE et al., 2002; NICOLOSO et al., 2003). No caso da pereira um maior número de raízes foi encontrado com a diminuição dos teores de sacarose para 20 g L<sup>-1</sup> (LEITE et al., 2000). Alguns autores defendem a redução de sacarose no enraizamento para diminuir o impacto das plantas na aclimatização, uma vez que estas passam bruscamente de condições heterotróficas para autotróficas. A redução na concentração de sacarose faz com que a planta aos poucos se habitue às condições autotróficas.

O peso fresco e seco seguiram a mesma tendência da variável anterior (Figuras 2D e 2E), com aumento crescente até a concentração de 60 g L<sup>-1</sup> e decréscimo na

concentração seguinte, caracterizando um comportamento quadrático. À medida que se aumentam as concentrações de sacarose o peso seco se eleva. Isto pode ser observado também na variável conteúdo de água (2F), uma vez que a porcentagem de teor de água diminui com a elevação da concentração de sacarose no meio de cultura.

Mothé et al. (2008) também observaram o aumento na matéria seca em função do aumento das concentrações de sacarose para a cana-de-açúcar, o mesmo foi observado por Nicoloso et al. (2003) no ginseng brasileiro. Estes resultados mostram que plantas cultivadas em altas concentrações de sacarose acumulam mais fotossintetizados e absorvem mais minerais. Os grãos de amido acumulados no cloroplastídeo ocasionam a inibição da síntese da rubisco e clorofila, diminuindo as taxas fotossintéticas, a reduzida síntese de açúcares favorece o acúmulo de carboidratos (CALVETE et al., 2002; DIGNART, 2006).

#### 4.4 CONCLUSÃO

O uso de sacarose é importante para o enraizamento da cultivar RB966928 de cana-de-açúcar *in vitro*. A concentração de 60 g L<sup>-1</sup> é a mais viável por apresentar um maior número de raízes.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

BRAIBANTE, M. E. F.; PAZINATO, M. S.; ROCHA, T. R.; FRIEDRICH, L. S.; NARDY, F. C. A cana-de-açúcar no Brasil sob um olhar químico e histórico: uma abordagem interdisciplinar. **Química nova na escola**, v.35, n. 1, p. 3-10, FEV. 2013.

CALVETE, E. O.; KAMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura brasileira**, v. 20, n. 2, p. 186–191, 2002.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropropagação de *cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas**. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Agronomia. Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa – CNPH, 1998. p. 183-260.

KHAN, I. A.; DAHOT, M. U.; YASMIN, S.; et al. Effect of sucrose and growth regulators on the micropropagation of sugarcane clones. **Pakistan Journal of Botanical**, v. 38, n. 4, p. 961–967, 2006.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “*in vitro*” do porta-enxerto de pereira OH X F97. **Ciência Agrotécnica**, v.24, n.2, p.353-357, abr./jun., 2000.

MOTHÉ, G. P. B.; NETTO, A. T.; CRESPO, L. E. C.; CAMPOSTRINI, E. Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e qualidade de luz. **Plant Cell Culture Micropropagation.**, Lavras, v.4, n.2, p. 84-91, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum** 15:473-479, 1962.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] Cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 84–90, 2003.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W, B. Micropropagação de cana-de-açúcar com diodos emissores de luz e ajuste da concentração de sacarose do meio de cultivo. **Ciência Rural**, v.43, n.7, jul, 2013.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sacarose na fase de enraizamento *in vitro* de mamoeiro ‘Tainung 01’. **Scientia Agraria**, v.8, n.1, p.25-31, 2007

SINGH, B.; YADAV, G.; LAL, M. An efficient protocol for micropropagation of sugarcane using shoot tip explants. **Sugar tech**, v. 3, n. 3, p. 113–116, 2001.

SORACE, M.; DE FARIA, R. T.; DAMASCENO, C. V.; et al. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 775–782, 2008.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E. C.; KLERK, G-J; ROBERTS, A.; GEORGE, E. F. The Components os Plant Tissue Media II. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Netherlans, Springer. V. 1, p. 115 - 174, 2008.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A micropropagação é uma ferramenta valiosa para a produção em larga escala de mudas de qualidade, por isto é de grande importância o desenvolvimento de protocolos de micropropagação viáveis. Desta maneira o trabalho aqui desenvolvido é apenas o início para a produção em larga escala de cana-de-açúcar cultivar RB966928 *in vitro*. Neste material constam os primeiros passos para um protocolo eficiente da cultivar, mais trabalhos precisam ser realizados para a otimização da micropropagação para que a produção em larga escala seja utilizada em biofábricas, dada a importância da cultivar para o país.

Abaixo seguem algumas sugestões para trabalhos posteriores:

A utilização de antioxidantes no meio de cultura para a brotação de meristemas pode ser um aliado da cultura de meristemas, assim evitando perdas na fase mais delicada da micropropagação.

Trabalhos complementares testando concentrações de sacarose no enraizamento e avaliando outras variáveis como: volume, peso fresco e seco das raízes, testes com sacarose em outras fases de cultivo *in vitro* e em biorreator podem trazer ganhos na micropropagação da cultivar.

As plantas aqui micropropagadas devem ser acompanhadas no campo para serem comparadas com plantas do plantio convencional por colmos. Além disto, é de grande importância realizar trabalhos para avaliar a fidelidade genética do material propagado *in vitro*, para verificar se o material fornecido para o plantio no campo não possui variações somaclonais.