

Efeito de diferentes concentrações de BAP e Cinetina na micropropagação *in vitro* das variedades RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*).

Vieira, Rafael Augusto¹; Silva, Clandio Medeiros da²; Souto, Eliezer Rodrigues de³; Machado, Maria de Fátima Pires da Silva⁴; Hata, Fernando Teruhiko⁵; Marcuz, Fernanda Santos⁶.

¹ Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Agronomia, Av. Colombo, 5.790, CEP 87020-900, Maringá-PR, fone: (044) 99345186, e-mail: rfavieira@msn.com; ² Professor Doutor, e-mail: clandiomedeiros@uol.com.br; ³ Professor Doutor, e-mail: ersouto@uem.br; ⁴ Professora Doutora, Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Biologia Celular e Genética, Av. Colombo, 5.790, CEP 87020-900, Maringá-PR, e-mail: mfpsmachado@uem.br; ⁵ Graduando em Agronomia, e-mail: prox_fdinhu@hotmail.com; ⁶ MSc. em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, email: fernandamarcuz@yahoo.com.br;

INTRODUÇÃO

A micropropagação é a principal técnica de cultura de tecidos com potencial de utilização na agricultura. A aplicação da propagação *in vitro* em cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) é uma alternativa vantajosa em programas de melhoramento para a multiplicação de variedades, devido à economia de tempo em relação às técnicas convencionais (Lee, 1984). Aliado a isso, obtêm-se mudas de excelente qualidade fitossânitaria, geneticamente uniformes e idênticas ao material vegetal de origem.

No entanto, para que o uso prático tenha viabilidade econômica, faz-se necessária a otimização das condições de cultivo para cada espécie e/ou variedade que se deseja multiplicar. Dentre os fatores relevantes à otimização do protocolo de micropropagação e que possuem relação direta com o desenvolvimento dos explantes, a relação das concentrações de fitohormônios suplementados no meio de cultura tem papel destacado.

Em Amoreira-preta cv. Tupy, a utilização de 6-benzilaminopurina promove aumento na taxa de multiplicação até a concentração de 5,1µM (Erig et al., 2002). Porém, para outras frutíferas, como as da família *Prunaceae*, tais como a Ameixeira 'Santa Rosa' e o pessegueiro, a literatura indica uma correlação negativa entre o aumento da concentração de BAP e o alongamento dos brotos (Rogalski et al., 2003)

Segundo George & Sherrington (1984), o crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos fitohormônios existentes no meio de cultura, principalmente citocininas e auxinas. As citocininas são utilizadas para quebrar a dominância apical dos brotos, e aumentar a taxa de multiplicação. Deste modo, ocorre um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de meristemas apicais da variedade RB867515 e brotações da variedade RB855156 de cana-de-açúcar, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com nove diferentes concentrações das citocininas 6-benzilaminopurina e cinetina, e aperfeiçoar o protocolo de micropropagação empregado para a obtenção de mudas de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá – PR, com material vegetal fornecido pela Usina de Álcool e Açúcar USASIGA, localizada em Cidade Gaúcha – PR.

Para o Experimento I, as gemas da variedade RB867515, foram individualizadas e lavadas em hipoclorito de sódio comercial a 20% (v/v) por 40 minutos. Em seguida, enxaguou-se as gemas em água corrente e plantou-se em substrato estéril por 25 dias a 30°C. Ao atingirem cerca 20-25 cm de altura, segmentos

do colmo com cerca de 50 mm, foram extraídos e esterilizados durante 1 minuto em álcool 70% (v/v), 20 minutos em solução de hipoclorito a 20% (v/v) e por fim lavados por três vezes em água destilada autoclavada. Após o processo de assepsia, sob condições estéreis, isolou-se os ápices caulinares em câmara de fluxo laminar com o auxílio de lupa e inoculou-se em tubos de ensaio contendo o meio de cultura próprio de cada tratamento. Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso com, em média, quatro repetições por tratamento. A cultura *in vitro* foi realizada em meio MS ajustado para pH 5.8, suplementado com 1,0 mg/L de tiamina, 100,0 mg/L de inositol, 20.000 mg/L de sacarose e nove diferentes associações de concentrações das citocininas 6-benzilaminapurina e cinetina (Meio 1: Sem adição de fitohormônios; Meio 2: 0,1 mg/L BAP; Meio 3: 0,2 mg/L BAP; Meio 4: 0,1 mg/L KIN; Meio 5: 0,1 mg/L BAP e 0,1 mg/L de KIN; Meio 6: 0,2 mg/L BAP e 0,1 mg/L KIN; Meio 7: 0,2 mg/L KIN; Meio 8: 0,1 mg/L BAP e 0,2 mg/L KIN; Meio 9: 0,2 mg/L BAP e 0,2 mg/L KIN;). A cultura de tecidos foi conduzida em sala de crescimento com temperatura de 25°C, intensidade luminosa de 1.500 lux e fotoperíodo de 12 horas de luz. Foi realizada a avaliação visual dos tratamentos aos 21 dias de desenvolvimento e usou-se como critérios de avaliação, o crescimento lateral e apical dos meristemas, comparando entre os tratamentos e com o meio usual de cultura de tecidos para a cana-de-açúcar (Meio 6; Testemunha).

No Experimento II, obteve-se por micropropagação nos meios 5 e 6, brotações da variedade RB855156. Com aproximadamente 60 dias em câmara de crescimento, as brotações foram transferidas para meio de cultura desprovido de fitohormônios (Meio 1), onde permaneceram por 14 dias. Feito isso, os brotos foram individualizados em câmara de fluxo laminar, pesados, e inoculados nos respectivos meios de cultura regulados para pH 4.0. Após 18 dias em câmara de crescimento, sob as mesmas condições do Experimento I, os propágulos foram pesadas novamente. Portando desses dados, foi calculado o percentual de ganho de massa fresca para os tratamentos. Os percentuais correspondentes foram submetidos à análise de variância e Tukey a 5%. A análise dos percentuais de ganho de massa dos tratamentos foi realizada. no programa SASM-Agri (Godoy, 2001). O delineamento foi inteiramente ao acaso, com seis repetições por tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento foi observado que o aumento da concentração de BAP e KIN na cultura *in vitro* da cana-de-açúcar não possui relação diretamente proporcional com o desenvolvimento dos meristemas apicais de cana-de-açúcar. Dessa forma, pode-se inferir que o balanço das concentrações dos reguladores de crescimento é um fator relevante na morfogênese e multiplicação de meristemas em cana-de-açúcar. Os meios 5 e 6 propiciaram desenvolvimento superior, sendo, portanto os mais recomendados para cultura de meristemas da variedade RB867515 (Quadro 1).

Quadro 1. Avaliação comparativa de crescimento lateral e apical dos ápices caulinares nos nove tratamentos aos 21 dias de cultura *in vitro*.

Meio de cultura	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grau de Desenvolvimento	**	**	**	*	***	***	*	*	*

(*) Grau 1: Desenvolvimento fraco; (**) Grau 2: Desenvolvimento regular; (***) Grau 3: Desenvolvimento bom.

No entanto, o meio 5 apresentou maior grau de desenvolvimento, comparado aos demais tratamentos, superando inclusive o meio usual (Meio 6) quanto ao crescimento lateral e apical. (Figura 1)

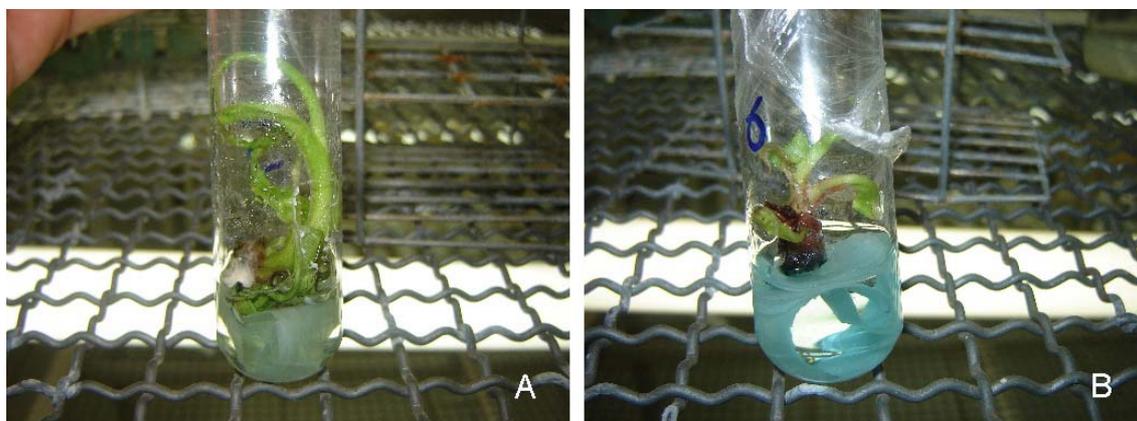


Figura 1. Desenvolvimento de meristema apical de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) variedade RB867515 no meio 5 (A) e no meio 6 (B).

No segundo experimento, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos a níveis de 1% e 5% no teste F (Quadro 2). Segue no Quadro 3 as médias dos percentuais de ganho de massa fresca dos nove meios testados.

Quadro 2. Análise de variância para o segundo experimento.

Causa da Variação	G.L	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Tratamento	8	4617,157	577,145	2,108	2,187	3,006	Ns
Resíduo	39	10679,973	273,845				
Total	47	15297,130					
C.V.		30,52%					

Quadro 3. Percentual de ganho de massa fresca por tratamento.

Meio de Cultura	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% de ganho de massa fresca	36,80	67,42	60,63	44,86	59,18	68,35	47,54	54,58	50,59

CONCLUSÕES

Os meios 5 e 6 são os mais adequados para a cultura de meristemas de cana-de-açúcar variedade RB857515, pois propiciaram a melhor interação e balanço fitohormonal, favorecendo o crescimento e a morfogênese do explante.

O aumento das concentrações de fitohormônios no meio de cultura não implicou necessariamente no melhor desenvolvimento, tanto para meristemas quanto

para as brotações, confirmando que a interação e o balanço das citocininas 6-benzilaminopurina e Cinetina tem efeito sob a cultura *in vitro* de cana-de-açúcar.

Para as brotações da variedade RB855156, os meios de cultura não apresentaram diferença significativa de ganho de massa fresca. No entanto, foi observado maior número de brotações laterais no meio 6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ERIC, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R.L. 6- Benzilaminopurina e ácido indolburítico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.) cv. Tupy. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, 2002.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture*. Eversley : Exegetics, 1984. 709p.

GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/Embrapa, p.99-169, 1990.

LEE, T.S.G. Micropropagação de cana-de-açúcar através de cultura de meristema apical. *Saccharum APC*, v.7, p. 36-39, 1984.

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

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; DA SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira Santa Rosa: Efeito da citocinina BAP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 365-367, 2003.

PALAVRAS-CHAVES

Saccharum spp.; cultivo *in vitro*; citocininas;