

# Avaliação de acessos de *Saccharum* quanto à tolerância in vitro ao alumínio

Lucas Henrique Andrade Nascimento<sup>1</sup>, Leila Albuquerque Resende de Oliveira<sup>2</sup>, Annie Carolina Araújo de Oliveira<sup>3</sup>,  
Adriane Leite do Amaral<sup>4</sup>, Lizz Kezzy de Moraes<sup>5</sup> e Ana da Silva Léo<sup>6</sup>

**Resumo** - O Brasil vem se destacando no cenário internacional quanto à produção de energia renovável. As fontes renováveis de energia como biomassa têm despertado grande interesse da pesquisa, que tem buscado incessantemente por cultivares mais produtivas sob condições desfavoráveis de cultivo. Dentre as biomassas mais utilizadas e com maior potencial para produção de energia, a cana-de-açúcar destaca-se no cenário nacional. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar um acesso da espécie *Saccharum spontaneum* do Complexo *Saccharum* do BAGCana da Embrapa quanto à tolerância ao estresse abiótico de toxidez por alumínio em condições de cultivo in vitro. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju. Para tanto foram utilizadas brotações adventícias, cultivadas em meio Murashige e Skoog líquido, suplementado com 2% de sacarose, na presença de cinco concentrações (0 µM, 200 µM, 350 µM, 500 µM, 650 µM) de AlCl<sub>3</sub>. Número de brotações, comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da raiz e parte aérea foram analisados. Com base nos resultados o *S. spontaneum* mostrou-se tolerante aos níveis de Al testados.

**Termos para indexação:** biomassa, cana-de-açúcar, tolerância.

## Introdução

O Brasil vem se destacando no cenário internacional quanto à produção de energia renovável. Embora apenas 10% da energia primária do mundo seja derivada de fontes renováveis, cenários globais apontam para um aumento de 40% da demanda de energia entre 2013 e 2035. As fontes renováveis de energia como biomassa, Pequena Central Hidrelétrica (PCH), eólica, termelétrica e solar representaram 41% da matriz energética brasileira em 2013 (Plano Decenal de Expansão de Energia 2023, Ministério de Minas e Energia). O país é modelo em geração sustentável de energia e considerado protagonista na substituição dos combustíveis fósseis.

Dentre as biomassas mais utilizadas e com maior potencial para produção de energia, a cana-de-açúcar destaca-se no cenário nacional por apresentar uma área plantada de 8,7 milhões de hectares e uma produção de 684,77 milhões de toneladas, sendo 47,88% destinados à produção de açúcar e 52,12% ao etanol (CONAB, 2016). Além dos produtos açúcar e álcool, o bagaço produzido nas usinas é utilizado na geração de eletricidade, contribuindo para a diversificação do setor sucroenergético e aumento de sua receita.

Na cana com o ideótipo para energia, chamada de “cana energia”, busca-se a variabilidade existente do material selvagem, alta produção de biomassa, alto teor de fibra e maior adaptação às condições adversas de cultivo, favorecendo a exploração em ambientes restritivos ao cultivo da cana convencional. Para promover e incrementar a fibra na cana energia é necessário acessar germoplasma silvestre, contido em bancos de germoplasma, que apresentam aptidão para alta produção de biomassa, elevado teor de fibra, além da grande capacidade de perfilhamento (Carvalho Neto et al., 2014; Matsuoka et al., 2014).

*Saccharum spontaneum* é descrita como uma espécie altamente polimórfica, com grande variabilidade entre plantas, e por apresentar alta adaptabilidade, podendo ser encontradas em diversos ambientes (desertos, baixadas encharcadas, rochas, regiões litorâneas etc), altitudes (do nível do mar às montanhas do Himalaia) e condições climáticas (de regiões de clima tropical a locais de inverno nevado) (Pange, 1933; Pange; Srinivasan, 1957). Pela grande variabilidade, *S. spontaneum* é a espécie que mais contribuiu com características de interesse agrônomo, além de ser uma das principais fontes de fibra aos programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de variedades com grande potencial para a produção de biomassa. A alta produtividade e resistência a estresses bióticos e abióticos encontrados nas variedades híbridas são em grande parte atribuíveis a *S. spontaneum* (Naidu; Sreenivasan, 1987; Roach, 1977).

O atendimento à demanda por biomassa para produção de bioenergia deverá estar aliado à proteção dos ecossistemas e a garantia da segurança alimentar. Desta forma, a produção de biomassa para produção de energia deverá se expandir preferencialmente para áreas degradadas ou de baixa aptidão agrícola, o que irá requerer o desenvolvimento de genótipos adaptados aos ambientes de produção marginais, tanto em termos climáticos quanto edáficos.

<sup>1</sup>Graduando em Agronomia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Engenheira Florestal, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE.

<sup>3</sup>Engenheira Florestal, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE.

<sup>4</sup>Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Regiões restritivas com acidez de solo apresentam alumínio em sua composição. Nessas regiões as raízes da cana-de-açúcar não se desenvolvem adequadamente inibindo a absorção de nutrientes e favorecendo a susceptibilidade à seca (Llugany et al., 1994; Foy et al., 1978; Kochian, 1995). Devido à grande variabilidade genética, intra e interespecífica de acessos *Saccharum*, o *screening* é uma abordagem apropriada para identificar o desempenho de genótipos quanto à resistência ao Al (Cançado et al., 2009). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar um acesso da espécie *Saccharum spontaneum* do Complexo *Saccharum* do BAGCana da Embrapa quanto à tolerância ao estresse abiótico de toxidez por alumínio em condições de cultivo in vitro.

## Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe.

### Material vegetal

Como material vegetal, foram utilizadas brotações do acesso NSL291970 - *Saccharum spontaneum*, previamente estabelecido in vitro. Esse acesso foi proveniente da National Center for Genetic Resources Preservation/ARS/USDA, Fort Collins, CO, USA, e faz parte do Banco ativo de Germoplasma de Cana-de-açúcar da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

### Multiplicação dos acessos

A cada 30 dias, as brotações foram multiplicadas em ambiente asséptico, em tubos de ensaio contendo 20 mL do meio de multiplicação (MM) consistindo em sais do meio MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementados com 2% de sacarose, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina - Sigma-Aldrich) + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (Sigma-Aldrich), gelificado com 3,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma-Aldrich) e pH ajustado para 5,8. O meio foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos, em todas as fases. As culturas foram mantidas sob condições de temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C), fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de 60 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

### Instalação dos ensaios in vitro

Para o *screening* in vitro quanto a tolerância ao alumínio foi utilizada a metodologia adaptada de Cançado et al. (2009). Brotações adventícias de 3 cm, enraizadas dos acessos oriundas do segundo subcultivo foram transferidas para meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) líquido, com base de suporte de isopor esterilizado, suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, em cinco diferentes concentrações de Cloreto de Alumínio (AlCl<sub>3</sub>) (0 µM; 200 µM, 350 µM, 500 µM e 650 µM), com pH ajustado para 4.2. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento sob condições de dia longo (16/8 h ciclo de luz/escuro) a uma temperatura de 25 °C ± 2 °C e umidade relativa de 60% a 70%, com luz sendo fornecida por câmaras de ar brancas fluorescentes (60 W, photon densidade de fluxo de 50 mmol m<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup>).

Para o enraizamento, brotações foram inoculadas em meio de cultura MS, suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,7 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético), gelificado com 1,5 g L<sup>-1</sup> de phytigel®, e pH ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento sob condições de dia longo (16/8 h ciclo de luz/escuro) a uma temperatura de 25 °C ± 2 °C e umidade relativa de 60% a 70%, com luz sendo fornecida por câmaras de ar brancas fluorescentes (60 W, photon densidade de fluxo de 50 mmol m<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup>), até atingirem 1 cm de raiz.

### Avaliações de crescimento

Aos 30 dias, foram realizadas avaliações biométricas (número de brotações, crescimento da parte aérea e crescimento de raiz), massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR). Para obtenção do resultado do crescimento de parte aérea e raiz foi realizada a subtração entre o comprimento aos 30 dias e 0 dias (no início do experimento). Para obtenção da MSPA e MSR os acessos cultivados in vitro que receberam as diferentes concentrações foram coletados e a parte vegetativa secadas em estufa de aeração forçada a 60 °C até atingir peso constante.

### Análise estatística

O delineamento experimental será inteiramente casualizado, em cinco repetições para cada avaliação. Para os níveis de AlCl<sub>3</sub>, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância e, realizada a análise de regressão e ajustadas equações. Para as análises foi utilizado o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

## Resultados e Discussão

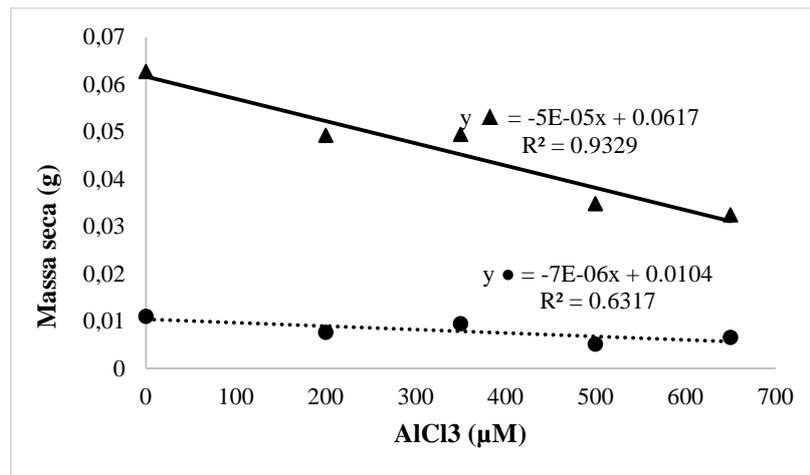
O comportamento do acesso quanto à toxicidade por Al foi avaliado com a aplicação de modelos de regressão, os quais demonstraram que não houve significância. Comparando-se as médias, quanto ao número de brotações, crescimento de parte aérea e da raiz, não houve diferença estatística entre os tratamentos utilizados, como pode ser observado pela comparação das médias com a da testemunha, demonstrando que o acesso é tolerante aos níveis de alumínio testados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de brotações, crescimento da parte aérea e da raiz de brotações de *S. spontaneum* submetidos ao estresse por toxicidade de alumínio in vitro.

Tratamento	Número brotações	Crescimento parte aérea (cm)	Crescimento raízes (cm)
0	2,5000 a	20,8750 a	0,5562 a
200	2,1429 a	22,4642 a	0,5428 a
350	2,2000 a	22,0333 a	0,5733 a
500	1,7857 a	20,0714 a	0,4571 a
650	2,0714 a	19,7857 a	0,3000 a
<b>CV %</b>	20,65	8,83	28,68

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para a massa seca de parte aérea e da raiz houve redução linear significativa à medida que se aumentou o cloreto de alumínio (Figura 1).



**Figura 1.** Efeito do estresse por toxicidade de alumínio in vitro na massa seca de parte aérea (▲) e raízes (●) de *S. spontaneum* (acesso NSL291970).

O primeiro sintoma da toxicidade do Al detectável é extremamente rápido, em questão de minutos inibe o crescimento da raiz, resultando em redução e danos no sistema radicular (Barceló; Poschenrieder, 2002). A rápida resposta da raiz indica que num primeiro momento o Al inibe a expansão e alongação das células das raízes, e depois a divisão celular também passa a ser inibida (Kochian, 1995; Matsumoto, 2000). Porém, em alguns trabalhos, a tendência de inibição do alongamento radicular não acompanhou necessariamente o incremento da concentração de Al em solução, como já foi relatado em cana-de-açúcar por Hetherington et al, 1988.

Em outro trabalho realizado por Oliveira (2012) em cana-de-açúcar em solução nutritiva utilizando dez concentrações crescentes de Al permitiu-se visualizar o comportamento das variedades, mas a queda no crescimento radicular foi muito sensível, mesmo utilizando ampla faixa de concentrações de Al, diferentemente da maioria dos trabalhos com outras gramíneas que trabalham com poucas doses. Nesse trabalho o autor observou que o crescimento radicular não apresentou queda no crescimento nas primeiras doses, a maioria das variedades apresentou decréscimo no crescimento somente a partir de 500 µmol.L<sup>-1</sup>.

Embora, vários trabalhos mostrarem os efeitos negativos do Al, existem trabalhos que mostram efeitos benéficos em algumas espécies. Uma possível explicação é o aumento da disponibilidade de Fe no meio de crescimento, resultando na hidrólise de Al e pH mais baixo. Thawornwong e Diest (1974) mostraram que o desenvolvimento do arroz foi estimulado na presença de baixas concentrações de Al em solução nutritiva. Isto sugere que em arroz, uma pequena quantidade de Al seja necessária para o desenvolvimento normal da planta.

O valor econômico e ambiental de uma planta tolerante à qualquer situação de estresse é indiscutível, já que pode significar a redução de custos e dos impactos do uso exagerado dos fatores de produção. Estas espécies tolerantes se comportam de forma eficiente e a identificação destas variedades pode contribuir para sistemas sustentáveis de produção por oferecer garantias do sucesso da expansão das fronteiras agrícolas da cultura, assim como maximizar a eficiência dos insumos, sobretudo irrigação e fertilização.

No presente estudo, os níveis de Al testados não foram suficientes para provocar o estresse em *S. spontaneum*, sendo necessários novos estudos com doses mais elevadas.

## Conclusões

*Saccharum spontaneum* é tolerante a 650 µM de AlCl<sub>3</sub> in vitro.

Novos estudos devem ser realizados para identificar o ponto crítico de Al para a espécie em questão.

## Agradecimentos

CNPq/Fapitec/Fapeal/Pibic/Embrapa/CPATC

## Referências

- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 48, n. 1, p. 75-92, 2002.
- CARVALHO-NETTO, O. V., BRESSIANI, J. A., SORIANO, H. L.; FIORI, C. S.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, G. V. S.; XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A.; PEREIRA, G. A. G. The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. **Chemical and Biological Technologies In Agriculture**, v. 1, 2014.
- CANÇADO, G. M. C.; RIBEIRO, A. P.; PIÑEROS, M. A.; MIYATA, L. Y.; ALVARENGA, Â. A.; VILLA, F.; PASQUAL, M.; PURGATTO, E. Evaluation of aluminium tolerance in grapevine rootstocks. **Vitis**, v. 48, n. 4, p. 167-173, 2009.
- CONAB. Conjuntura Mensal. **Cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2016. 6 p.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- FOY, C. D.; CHANEY, R. C.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review Of Plant Physiology**, v. 29, p. 511-566, 1978.
- HETHERINGTON, S. J.; ASHER, C. J.; BLAMEY, F. P. C. Comparative tolerance of sugarcane, navybean, soybean and maize to aluminium toxicity. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 39, p.171-176, 1988.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology**, 46, p. 237-260, 1995.
- LLUGANY, M.; MASSOT, N.; WISSEMEIER, A. H.; POSCHENRIEDER, C.; HORST, W. J.; BARCELÓ, J. Aluminum tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 157, n. 6, p. 447-451, 1994.
- MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review Cytology**, v. 200, p. 1-46, 2000.
- MATSUOKA, S.; KENNEDY, A. J.; SANTOS, E. G. D.; TOMAZELA, A. L.; RUBIO, C. S. Energy Cane: its concept, development, characteristics, and prospects. **Advances in Botany**, v. 2014, p. 1-13, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAIDU, K. M.; SREENIVASAN, T. V. Conservation of sugarcane germplasm. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1987, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: Copersucar, 1987.
- OLIVEIRA, M. Z. **Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) à toxidez por alumínio em solução**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- PANGE, R. R. *Saccharum spontaneum* L. A comparative study of the forms grown at the imperial Sugarcane Breeding Station, Coimbatore. **Indian Journal of Agriculture Science**, v. 3, p. 1- 10, 1933.
- PANGE, R. R.; SRINIVASAN, K. Studies in *Saccharum spontaneum*. The geographical distribution of spikelet length. **Indian Journal Sugarcane Research & Development**, v. 1, p. 1-8, 1957.
- ROACH, B. T. *Saccharum spontaneum*: Utilization of wild germplasm in breeding. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v. 16, p. 233-238, 1977.
- THAWORNWONG, N.; DIEST, A. V. Influence of high acidity and aluminum on the growth of lowland rice. **Plant and Soil**, v. 41, n. 1, p. 141-159, 1974.