

Giovana Bomfim de Alcantara<sup>1</sup>, Marília Pereira Machado<sup>1</sup>, Daniel de Sousa Ribeiro<sup>1</sup>, Haline Helena Wippel<sup>2</sup>, João Carlos Bespalhok Filho<sup>3</sup>, Ricardo Augusto de Oliveira<sup>3</sup>, Edelclaiton Daros<sup>3</sup>

## Shoot multiplication, elongation and rooting *in vitro* of clones of sugarcane under different concentrations of 6-benzylaminopurine and gibberellic acid

### ABSTRACT

The culture of meristems allows obtaining plant sugarcane healthy with genetic stability and enables the production of a large number of seedlings during the year. The aim of this work was to establish suitable conditions for seedling production *in vitro* by meristems of three potential clones sugarcane (RB036091, RB036152 and RB036066). The multiplication and elongation of shoot buds were evaluated. The BAP (0, 0.444, 0.888 and 1.776 mM) was added in the medium for multiplication of shoot buds and GA3 (0, 0.3 and 0.6 mM) for elongation of shoot buds. Presence of BAP in the medium had an inhibitory influence on shoot buds height. The BAP in the medium promoted the tillering for the three clones. The GA3 increased the height of shoots for clones RB036152 and RB036066. The GA3 promoted the formation of a greater plant, however, fewer roots were formed for all clones tested. It was concluded that the concentration of 0.444 mM BAP promotes the multiplication of clones RB036091, RB036066 and RB036052. The clone RB036091 showed the higher multiplication rate. The GA3 promotes the elongation of the seedlings for clones RB036152 and RB036066.

**Key-words:** *Saccharum*L., micropropagation, meristems, seedling production.

## Multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações *in vitro* de clones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico

### RESUMO

A cultura de meristemas possibilita a obtenção de plantas de cana-de-açúcar sadias, além de garantir a estabilidade genética e a produção de um grande número de mudas, durante o ano inteiro. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer condições adequadas para a produção de mudas *in vitro* por meio de meristemas de três clones potenciais de cana-de-açúcar (RB036091, RB036152 e RB036066), sendo avaliados a multiplicação e o alongamento de suas brotações. Para a multiplicação das brotações foram aplicadas concentrações de BAP (0; 0,444; 0,888 e 1,776 µM) e para o alongamento das brotações foram testadas as concentrações de 0; 0,3 e 0,6 µM de GA3. As concentrações crescentes de BAP reduziram a altura das brotações, dos três genótipos avaliados e a adição de BAP no meio de multiplicação foi eficiente, na promoção de perfilhos para os três clones. O uso do ácido giberélico (GA3) favoreceu o aumento na altura das brotações, para os clones RB036152 e RB036066, contribuindo para a formação de uma planta maior e de melhor qualidade e o uso do GA3 provocou menor número de raízes formadas para todos os clones testados. Conclui-se que a concentração de 0,444 µM de BAP apresentou-se adequada para a multiplicação dos clones RB036091, RB036066 e RB036052. Dos três clones avaliados, o clone RB036091 apresentou maior taxa de multiplicação. O padrão de resposta do GA3 no alongamento das mudas varia de acordo com o genótipo, para os clones RB036152 e RB036066, ele promove a formação de mudas maiores.

**Palavras-chave:** *Saccharum* L., micropropagação, meristemas, produção de mudas.

Autor para correspondência.

<sup>1</sup>Pós-doutoranda/ Universidade Federal do Paraná, UFPR/ Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo/ [giobomfim@hotmail.com](mailto:giobomfim@hotmail.com)\*; [ma\\_rilia10@hotmail.com](mailto:ma_rilia10@hotmail.com);

<sup>2</sup>Alunos de Graduação em Agronomia, UFPR; [daniel.ufpr@hotmail.com](mailto:daniel.ufpr@hotmail.com); [halinehw@gmail.com](mailto:halinehw@gmail.com);

<sup>3</sup>Professor, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, UFPR; [joao.bespa@gmail.com](mailto:joao.bespa@gmail.com); [ededaros@ufpr.br](mailto:ededaros@ufpr.br)

## INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar destaca-se no cenário mundial principalmente por ser fonte de energia renovável, pela produção de álcool e por contribuir na produção de 65% do açúcar mundial. É cultivada em regiões tropicais e subtropicais de mais de 70 países e o Brasil desponta como líder mundial na utilização de cana-de-açúcar como fonte de energia renovável e em exportações de açúcar. O setor sucroalcooleiro responde por um faturamento anual da ordem de US\$ 7 bilhões. Atualmente, as cultivares de cana cultivadas são o resultado do cruzamento interespecífico entre *Saccharum officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*.

Em decorrência da posição de destaque que ocupa na economia, existe interesse no desenvolvimento de programas de melhoramento genético com a espécie. Neste sentido, a micropropagação massal tem sido usada para a multiplicação de novas variedades em diversos países produtores de cana-de-açúcar, e tem garantido a produção de mudas livres de pragas e doenças, passíveis de transmissão pelos métodos tradicionais de propagação (Geijskes et al. 2003). A cana-de-açúcar foi uma das primeiras culturas industriais a ser micropropagada comercialmente.

A existência de plantas livres de pragas e doenças é de suma importância para a boa qualidade das mudas formadas. A cultura de meristemas apresenta-se como uma possibilidade na obtenção de plantas de cana-de-açúcar sadias, além de garantir a estabilidade genética e a produção de um grande número de mudas, durante o ano inteiro (Geijskes et al. 2003; Lakshmanan 2006). Entretanto, tem-se observado diferenças nas respostas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar durante o estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização. Como a resposta morfogênica é influenciada pelo genótipo, é fundamental que seja realizada adaptação dos protocolos para cada cultivar.

Visando estabelecer condições adequadas para a produção de mudas por meio de meristemas de três clones potenciais de cana-de-açúcar (RB036091, RB036152 e RB036066), o presente trabalho teve como objetivo otimizar as condições para a sua multiplicação, alongamento e enraizamento, cultivados *in vitro* sob o efeito de diferentes concentrações de BAP e de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

## MATERIAL E MÉTODOS

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

Plantas de cana-de-açúcar, clones RB036091, RB036152 e RB036066, fornecidos pela RIDESA, com um mês de cultivo foram utilizadas para os estudos. Folhas imaturas (cilindro de aproximadamente 2 x 10 cm) foram desinfestadas por 1 min com etanol 70% (v/v), enxaguadas três vezes com água destilada esterilizada, incubadas por 20 min em solução de 2,0% (v/v) de hipoclorito de sódio e enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada. Segmentos transversais da região meristemática foram removidos e os meristemas foram isolados com o auxílio de um estereomicroscópio em câmara de fluxo laminar. O isolamento dos meristemas ocorreu em meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) semi-sólido, suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Após o isolamento, a multiplicação dos meristemas foi realizada em meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) líquido, suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e diferentes concentrações da citocinina BAP (6-benzilaminopurina) (0; 0,444 µM; 0,888 µM; 1,776 µM). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Após 15 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis altura das brotações, número de folhas e número de perfilhos por explante.

Os subcultivos foram realizados a cada 15 dias num total de cinco subcultivos. No quinto subcultivo as brotações foram transferidas para o meio MS, suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-butírico e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), sendo testados as concentrações de 0; 0,3 e 0,6 µM de GA<sub>3</sub>. Após 30 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis altura e massa fresca das brotações, número de raízes e massa fresca de raízes.

As culturas foram mantidas a 25 ± 2 °C, no escuro na primeira semana, 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.

Para a multiplicação das brotações, na qual foram testadas concentrações de BAP, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4 (três clones

e quatro concentrações de BAP). Para testar a homogeneidade das médias utilizou-se o teste de Bartlett, posteriormente os dados foram submetidos à Anova (Análise de variância), seguida de análise de regressão. Para o alongamento das brotações o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3 (três clones e três concentrações de GA<sub>3</sub>), com quatro repetições, sendo cada repetição composta de 5 explantes. Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett analisados por Anova e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05). Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa computacional Sisvar<sup>®</sup> (Ferreira 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

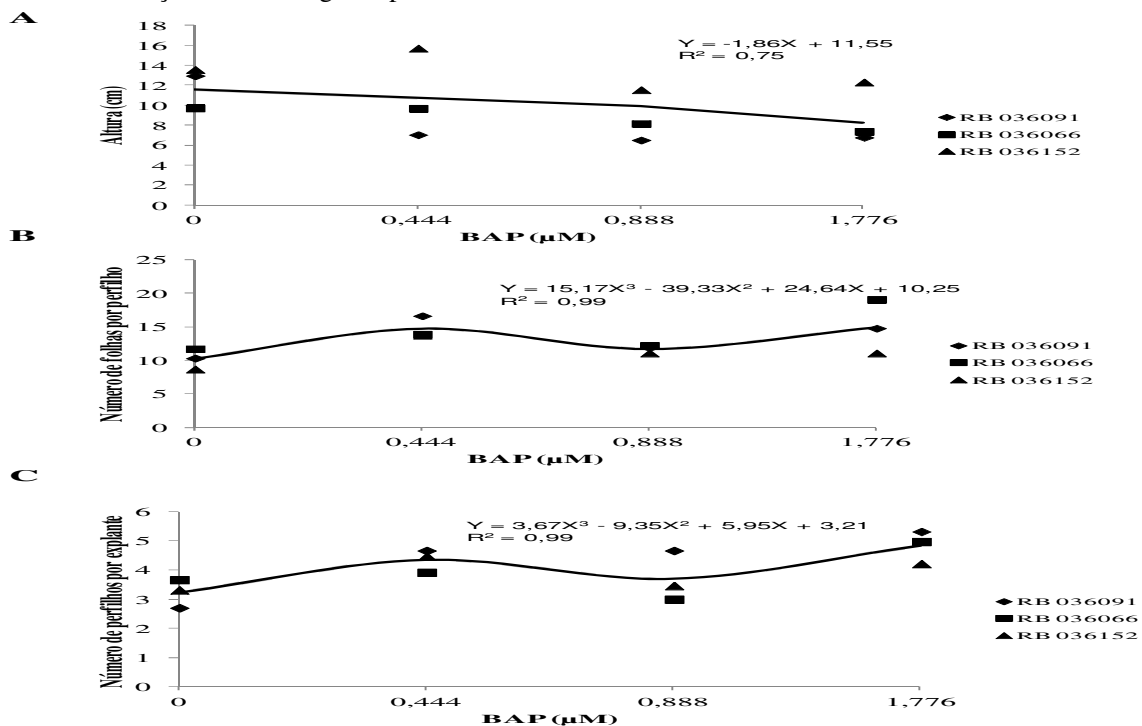
Os resultados da ANOVA mostraram que as variáveis analisadas apresentaram variâncias dos tratamentos homogêneas. A análise também revelou que não houve interação significativa a 5% de probabilidade entre os fatores concentrações de BAP e tipos de clones, indicando a independência dos fatores testados. Foi verificado efeito significativo a 5% de probabilidade apenas para concentrações de BAP.

As concentrações crescentes de BAP reduziram a altura das brotações, dos três genótipos avaliados,

apresentando regressão linear negativa. O clone RB036091 apresentou a maior altura das brotações (de 11,54 cm até 15,7 cm), porém a concentração de 0,444 μM conferiu a maior altura das brotações (Figura 01A). Trabalhando com três variedades de cana-de-açúcar, Khan et al. (2009), obtiveram brotações com altura máxima de 12 cm em meio de cultura suplementado com 4,44 μM de BAP.

O efeito de BAP no número de folhas por perfilho pode ser observado na Figura 01B. O clone RB036066 obteve o maior número de folhas por perfilho na concentração de 1,776 μM de BAP (aproximadamente 19 folhas). Para o clone RB036091 a concentração de 0,444 μM de BAP promoveu em média cerca de 16 folhas por perfilho. Esta mesma concentração também foi a mais efetiva para o clone RB036052, obtendo-se aproximadamente 13 folhas por perfilho (Figura 01B).

A adição de BAP no meio de multiplicação foi eficiente, na promoção de perfilhos para os três clones. O clone RB036091 obteve as melhores respostas na produção de perfilhos em todas as concentrações de BAP, sendo que na ausência do regulador menos de três perfilhos por explante foram obtidos (Figura 01C).



**Figura 01** - Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP): A) na altura das brotações (cm); B) no número de folhas por perfilho; C) no número de perfilhos por explante; dos clones de cana-de-açúcar RB036091, RB036066 e RB036052 micropropagados aos 15 dias.

Concentrações mais elevadas de BAP (4,44  $\mu\text{M}$ ) foram necessárias para produzir aproximadamente 16 folhas por perfilho e cinco perfilhos por explante, em variedades de cana-de-açúcar na fase de multiplicação (Khan et al. 2009). A utilização de altas concentrações de reguladores vegetais possui o inconveniente de aumentarem as chances de ocorrer variação somaclonal, por isso, é possível que a multiplicação dos três clones avaliados pela técnica da micropropagação possa ser utilizada com sucesso para a produção de mudas saudáveis, pois foram testadas concentrações mais baixas de BAP (até 1,776  $\mu\text{M}$ ).

Para o alongamento das brotações os resultados da ANOVA mostraram que as variáveis analisadas apresentaram variâncias dos tratamentos homogêneas. A análise também revelou interação significativa a 5% de probabilidade entre os fatores concentrações de GA<sub>3</sub> e tipos de clones, indicando a dependência dos fatores testados.

O uso do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) favoreceu o aumento na altura das brotações, para os clones RB036152 e RB036066, contribuindo para a formação de uma muda maior e de melhor

qualidade. Já para o clone RB036091, a utilização do GA<sub>3</sub> não promoveu aumento na altura das brotações formadas. O clone RB036091 apresentou maior altura das brotações com o tratamento controle, no qual não foi utilizado GA<sub>3</sub>, diferindo estatisticamente dos demais clones testados. Com a utilização do GA<sub>3</sub> os clones RB036152 e RB036066 chegaram a atingir um padrão de resposta semelhante ao apresentado pelo clone RB036091 (Tabela 01). Neste sentido, quando as mudas produzidas *in vitro* não estão em condições de serem aclimatizadas, devido ao seu tamanho reduzido, o cultivo na presença de GA<sub>3</sub> pode provocar o alongamento das regiões vegetativas em alguns genótipos e, conseqüentemente, maior número de indivíduos poderá ser aclimatizado, diminuindo o período de permanência do material vegetal *in vitro* (Grattapaglia e Machado 1998).

Para a massa fresca das brotações o uso do GA<sub>3</sub> não apresentou efeito para os clones RB036091 e RB036066, já para o clone RB036152 promoveu a formação de mudas com maior massa fresca das brotações (Tabela 01).

**Tabela 01.** Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) na altura das brotações (cm) e massa fresca das brotações (g) dos clones de cana-de-açúcar RB036091, RB036066 e RB036052 micropropagados.

GA <sub>3</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Altura brotações (cm)			Massa fresca das brotações (g)		
	RB036091	RB036066	RB036152	RB036091	RB036066	RB036152
0	16,90 a A	9,78 b B	11,11 b B	0,27 a A	0,19 a AB	0,14 b B
0,3	12,94 b A	13,58 a A	16,93 a A	0,21 a AB	0,19 a B	0,28 a A
0,6	15,43 a A	13,57 a A	16,46 a A	0,30 a A	0,17 a B	0,21 ab B
CV (%)	17,6			23,5		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, para os tratamentos de GA<sub>3</sub> e médias seguidas, pela mesma letra maiúscula na horizontal, para os clones, não diferem pelo teste de Tukey (P < 0.05).

O uso do GA<sub>3</sub> provocou menor número de raízes formadas para todos os clones testados (Tabela 02). O mesmo foi relatado por George (1993), que afirma que apesar de contribuir em alguns casos para a formação de raízes, a presença de GA<sub>3</sub> no meio de cultura frequentemente impede ou diminui a formação de raízes. Segundo o autor, a inibição no desenvolvimento do sistema radicular ocorre, principalmente se a concentração de GA<sub>3</sub> utilizada promover a formação de novas brotações. Essa afirmação foi constatada em *Nidularium innocentii* cultivada em meio duplo fase com 4.1 e 8.2  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>, no qual foi evidenciado a diminuição do número de raízes e o aumento do

número de brotos (Lopes da Silva et al., 2012). Outros autores também relataram a inibição na formação de raízes adventícias com a utilização dessa giberelina (Machado et al. 2011)

Os clones RB036091 e RB036066 apresentaram formação de maior número de raízes, quando comparados ao RB036152. O GA<sub>3</sub> não influenciou na massa fresca da raiz, para nenhum clone. O clone RB036091, apresentou maior massa fresca de raiz, com o tratamento controle e 0,3  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>, quando comparado aos demais clones. Com a concentração de 0,6  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>, os clones responderam de forma semelhante, não diferindo estatisticamente (Tabela 02).

**Tabela 02.** Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA3) no número de raízes por perfilho e massa fresca das raízes (g); dos clones de cana-de-açúcar RB036091, RB036066 e RB036052 micropropagados.

GA3 ( $\mu$ M)	N° raízes (g)			Massa fresca da raiz (g)		
	RB036091	RB036066	RB036152	RB036091	RB036066	RB036152
0	7,70 a A	9,50 a A	4,55 a B	0,04 a A	0,02 a B	0,00 a B
0,3	5,40 b AB	8,15 ab A	3,40 a B	0,03 a A	0,00 a B	0,00 a B
0,6	6,35 ab A	7,85 b A	1,65 b B	0,02 a A	0,02 a A	0,00 a A
CV (%)	29,5			72,5		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical, para os tratamentos de GA3 e médias seguidas, pela mesma letra maiúscula na horizontal, para os clones, não diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados conclui-se que a concentração de 0,444  $\mu$ M de BAP apresentou-se adequada para a multiplicação dos clones RB036091, RB036066 e RB036052. Dos três clones avaliados, o clone RB036091 apresentou maior taxa de multiplicação. O padrão de resposta do ácido giberélico (GA3) no alongamento das mudas de cana-de-açúcar varia de acordo com o genótipo, para os clones RB036152 e RB036066, ele promove a formação de mudas maiores. O GA<sub>3</sub> interfere negativamente no número de raízes formadas em mudas de cana-de-açúcar, clones RB036091, RB036152 e RB036066.

## AGRADECIMENTOS

A Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA) pelo fornecimento do material vegetal e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de estudos.

## REFERÊNCIAS

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; LAKSHMANAN, P.; MCKEON, M. G.; BERDING, N.; SWAIN, R. S.; ELLIOTT, A. R.; CROF, C. P. L.; JACKSON, J. A.; SMITH, G. A. Smart Sett TM seedling: tissue culture seed plant for the Australian sugar industry. **Sugar Cane International**, p. 13-17, 2003.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. The technology. 2.cd. Edington: Exegetics, Part 1. 574p., 1993.

GRATTAPAGLIA D. e MACHADO M. **Micropropagação**. In: Torres A.C.; Caldas L.S.; Buso, J.A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação de plantas. Brasília, EMBRAPA/CNPq. p.183-260, 1998.

KHAN, S. A.; RASHID, H.; CHAUDHARY, M. F.; CHAUDHRY, Z.; FATIMA, Z.; SIDDIQUI, S. U.; ZIA, M. Effect of cytokinins on shoot multiplication in three elite sugarcane varieties. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 4, p. 41651-1658, 2009.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane: Na addendum to the invited review. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 42, n. 3, p. 201-205, 2006.

LOPES da SILVA, A. L.; COSTA, J. L.; ALCANTARA, G. B.; CARVALHO, D. C.; SCHUCK, M. R.; BIASI, L.A. Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. And *Nidularium procerum* Lindm. (Bromeliaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 3, p. 1095-1101, 2012.

MACHADO, M. P.; SILVA, A. L. L. da; BIASI, L. A. Effect of plant growth regulators on in vitro regeneration of *Lavandula dentata* L. shoot tips. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 28-31, 2011.

MURASHIGE T. e SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue

cultures. **Plant physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962.

Recebido: 02/07/2013  
*Received: 07/02/2013*

Aprovado: 22/10/2013  
*Approved: 10/22/2013*