

## Multiplicação *in vitro* e Aclimação e Acessos do Complexo *Saccharum*

Ana da Silva Léo<sup>1</sup>

Aparecida Gomes de Araujo<sup>2</sup>

Adriane Leite do Amaral<sup>3</sup>

Tassiano Maxwell Marinho Câmara<sup>4</sup>

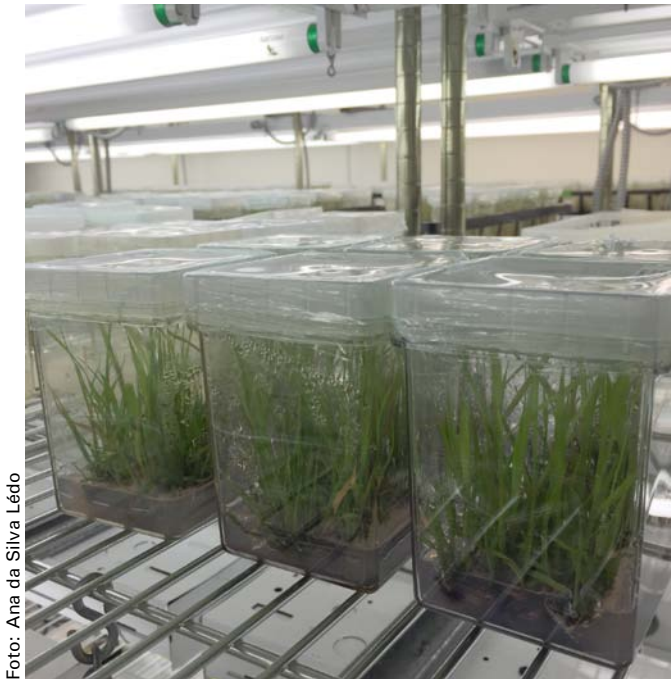


Foto: Ana da Silva Léo

### Introdução

O uso crescente de biomassa para a produção de bioenergia é uma estratégia importante para uma nova matriz energética mundial, sobretudo em áreas tropicais. Agregam-se a esta estratégia as possibilidades de uso de biomassa para a co-geração de energia (DURAES et al., 2008).

A cana-de-açúcar tem sido explorada há séculos para produção de açúcar e nas últimas décadas na produção comercial de biocombustíveis (etanol e energia elétrica pela queima da biomassa). O desenvolvimento/aprimoramento de tecnologias de fermentação direta do caldo e digestão da fibra, tem gerado perspectivas promissoras para o setor, como a produção de etanol proveniente da degradação das fibras (etanol 2G), outros biocombustíveis e diversos coprodutos valiosos (CARVALHO-NETTO et al., 2014). Essas mudanças têm demandado dos programas de melhoramento o desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar com atributos diferentes daqueles habitualmente observados nas

atuais cultivares, como a obtenção de variedades com menor teor de açúcar e maior de fibra, denominada “cana energia”.

Novas cultivares, priorizadas em programas de melhoramento genético que atendam às demandas do setor energético só podem ser obtidas desde que haja disponibilidade de variabilidade genética, apropriadamente conservada em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs). Diante da crescente demanda, a Embrapa tem fortalecido ações para a introdução, conservação de material genético de alto potencial produtivo de biomassa, excelente opção para o mercado da bioenergia no Brasil e no mundo, e, em parceria com o National Center for Genetic Resources and Preservation (NCGRP) do United States Department of Agriculture (USDA), introduziu, em 2012, 56 acessos do complexo *Saccharum* (*S. officinarum*, *S. robustum* e híbridos).

Parte desses acessos foi introduzida por cultura *in vitro* no Núcleo de Gestão da Estação Quarentenária de Germoplasma Vegetal (NEQGV) da Embrapa

<sup>1</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia/Biotecnologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia/Fitotecnia, bolsista DCR Embrapa Tabuleiros Costeiros/FAPITEC-SE/CNPq, Aracaju, SE.

<sup>3</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Melhoramento Genético, pesquisadora da Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Tabuleiros Costeiros (UEP - Rio Largo), Rio Largo, AL.

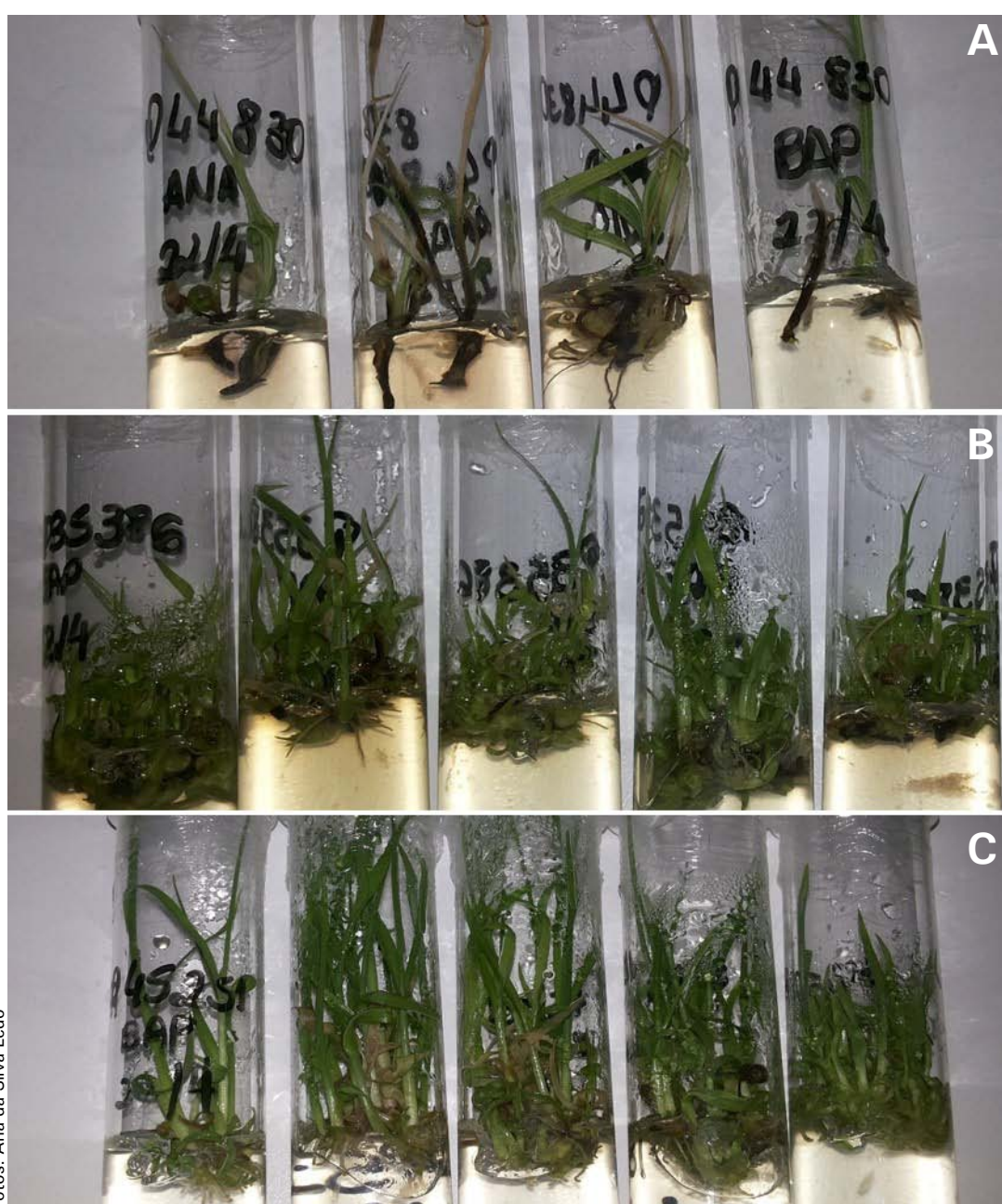
<sup>4</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Unidade de Execução de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Tabuleiros Costeiros, (UEP - Rio Largo), Rio Largo, AL.

Recursos Genéticos, em Brasília, DF. Após liberação, foram encaminhados ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros para multiplicação, aclimação e conservação no Banco Ativo de Germoplasma de Cana-de-Açúcar (BAG Cana CPATC), localizado em Nossa Senhora das Dores, SE.

O objetivo deste trabalho é descrever as etapas para a multiplicação e aclimação de acessos do complexo *Saccharum* após quarentena para implantação de BAGs e coleções de trabalho.

### Avaliação do vigor e estágio de desenvolvimento das culturas in vitro

As culturas mantidas em quarentena após a liberação devem ser avaliadas quanto ao vigor e estágio de desenvolvimento e separadas em três categorias (Figura 1): A) culturas com baixo vigor e poucas brotações; B) culturas vigorosas, com muitas brotações mas pouco alongamento da parte aérea (em tufos); C) culturas vigorosas e parte aérea alongada com desenvolvimento inicial ou não de raízes.



Fotos: Ana da Silva Lédio

**Figura 1.** Classificação das culturas in vitro de *Saccharum* sp. quanto ao vigor após quarentena: A) baixo vigor com poucas brotações; B) alto vigor mas com pouco alongamento da parte aérea; C) alto vigor e parte aérea alongada com desenvolvimento inicial ou não de raízes.



## Recuperação de plantas in vitro após quarentena

Culturas com baixo vigor devem ser repicadas para tubos de ensaio (22,5 mm x 150 mm) contendo meio de multiplicação 1 (6 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina-BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina)

e adição de antibiótico ampicilina (Tabela 1) para evitar contaminações bacterianas. Após a recuperação do vigor, as culturas poderão ser subcultivadas em meio de multiplicação 2 (1 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina) com menor concentração BAP.

**Tabela 1.** Composição dos meios de cultura nas etapas de multiplicação (MULT), alongamento (ALON) e enraizamento (ENR) para a regeneração de acessos do complexo *Saccharum*.

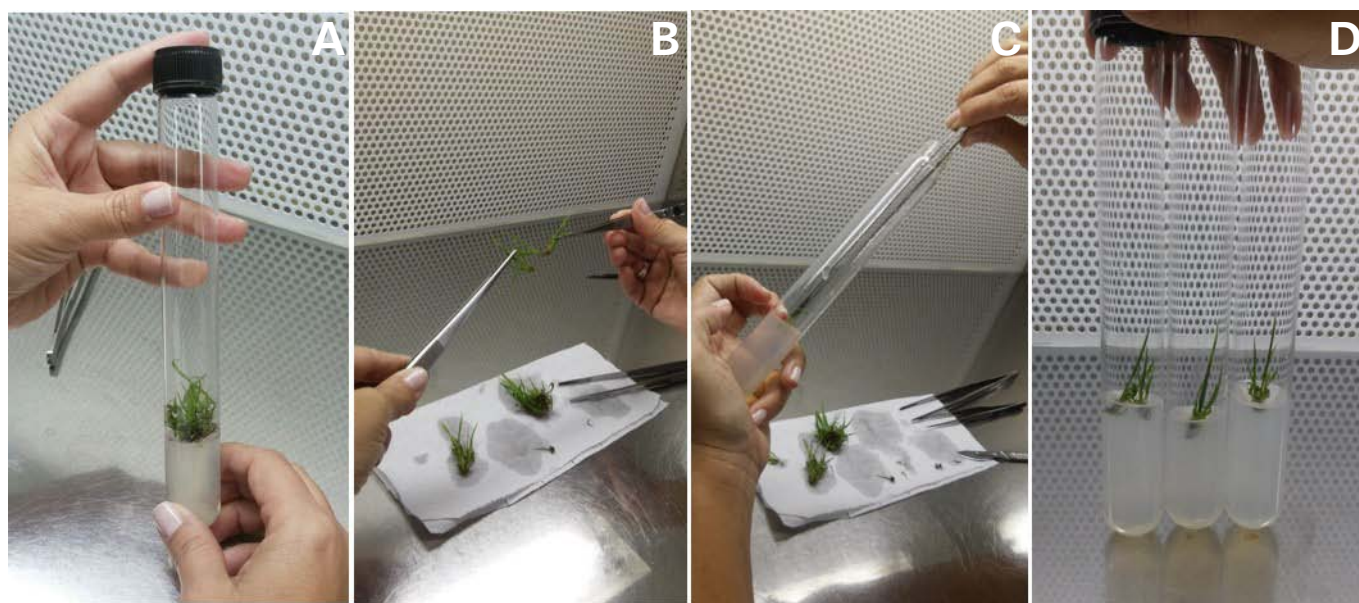
|                 | MULT 1                 | MULT 2                 | ALON                   | ENR 1                | ENR 2                |
|-----------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| Sais de MS      | 100%                   | 100%                   | 100%                   | 50%                  | 50%                  |
| Sacarose        | 2%                     | 2%                     | 2%                     | 2%                   | 2%                   |
| Phytigel®       | 0,4%                   | 0,4%                   | 0,4%                   | 0,4%                 | 0,4%                 |
| AIB             | -                      | -                      | -                      | -                    | 1 mg L <sup>-1</sup> |
| ANA             | -                      | -                      | -                      | 1 mg L <sup>-1</sup> | -                    |
| BAP             | 6 mg L <sup>-1</sup>   | 1 mg L <sup>-1</sup>   | -                      | -                    | -                    |
| Cinetina        | 0,1 mg L <sup>-1</sup> | 0,1 mg L <sup>-1</sup> | -                      | -                    | -                    |
| GA <sub>3</sub> | -                      | -                      | 0,5 mg L <sup>-1</sup> | -                    | -                    |
| Ampicilina      | 100 mg L <sup>-1</sup> | 100 mg L <sup>-1</sup> | 100 mg L <sup>-1</sup> | -                    | -                    |

MS- sais do meio de cultura padrão de Murashige e Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962); ANA- ácido naftaleno acético; AIB- ácido indol butírico, BAP-6-benzilaminopurina; GA<sub>3</sub>-ácido giberélico.

Fonte: Adaptado de Jalaja et al. (2008).

Os subcultivos devem ser realizados em intervalos de 30 dias e, no máximo cinco a seis subcultivos, para evitar a ocorrência de variação somaclonal. Culturas com adequado vigor, porém com brotações em tufo pouco alongadas (Figuras 1B e 2A), devem

ser transferidas para a etapa de alongamento, por 30 dias, com a repicagem (Figuras 2B, 2C e 2D) para tubos de ensaio (22,5 mm x 150 mm) contendo 20 mL do meio de alongamento.



Fotos: Sara Dayan

**Figura 2.** Etapas do subcultivo de *Saccharum* sp: A) culturas com desenvolvimento em tufo; B) divisão dos tufo de brotações (repicagem); C) inoculação de tufo menores; D) culturas subcultivadas.

Culturas com ótimo vigor e alongadas, com brotações de 4 a 5 cm de comprimento, são transferidas para a etapa de enraizamento com a repicagem para tubos de ensaio (22,5 mm x 150 mm) contendo 20 mL de meio de enraizamento 1 (1 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético-ANA).

No período de 15 a 25 dias espera-se a indução do sistema radicular. Entretanto, culturas que apresentam alongamento, mas com enraizamento deficiente em meio contendo ANA, são transferidas para uma nova etapa de enraizamento (último subcultivo antes da aclimação) em tubos de ensaio (22,5 mm x 150 mm) contendo 20 mL de meio de enraizamento 2 (1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol butírico-AIB).

Em todas as etapas descritas anteriormente, os tubos de ensaio poderão ser substituídos por frascos de vidro (capacidade 250 mL) ou de policarbonato (76,2 mm x 76,2 mm x 101,6 mm) com tampas de propileno, contendo de 30 a 60 mL de meio específico (Figura 3), com o objetivo de reduzir custos e otimizar o espaço físico. Nestas condições é possível manter de 6 a 9 culturas por frascos, a depender do vigor do acesso.



Foto: Ana da Silva Léo

**Figura 3.** Frascos de policarbonato com tampa de propileno para cultivo in vitro de *Saccharum* sp.

Todos os meios devem ter o pH ajustado para  $5,8 \pm 1$  e autoclavados por 20 minutos a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  e pressão de 1,05 atm. Após a autoclavagem, em câmara de fluxo laminar, o antibiótico ampicilina na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> deve ser adicionado por microfiltração (microfiltro de 0,2  $\mu\text{m}$ ) nos meios de cultura para prevenção de contaminação bacteriana.

As culturas, em cada etapa da micropropagação, devem ser mantidas em sala de crescimento à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar em torno de 70%, fotoperíodo de 12 horas de luz branca fria, sob 52  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$  de irradiância e 12 horas de escuro.

### Aclimação das mudas

Após cultivo em meio de enraizamento, as plantas são retiradas dos frascos com ou sem auxílio de pinça (Figura 4A) e procede-se a lavagem das raízes em água corrente e são colocadas em papel toalha para retirada do excesso de umidade (Figura 4B). Esta lavagem é importante para evitar resíduos de meio no sistema radicular e posterior contaminação do substrato e ambiente.



Fotos: Inácio Roque de Andrade

**Figura 4.** Preparo das mudas de *Saccharum* sp. para aclimação: A) retirada das mudas dos frascos de cultivo; B) lavagem das raízes; C) poda da parte aérea para uniformização; D) poda do sistema radicular.

Plantas com parte aérea muito desenvolvidas são podadas a 5 cm com auxílio de tesoura (Figura 4C), para uniformização e enviadas para aclimação em telado ou estufa agrícola dotado de sistema de irrigação por nebulização. Mudas com raízes longas também podem ser podadas a 1 cm (Figura 4D), para evitar danos durante o plantio.



Podem ser utilizados substratos comerciais contendo vermiculita ou fibra de coco, na proporção 1:1 e outras formulações. Os substratos devem ser esterilizados, para eliminar organismos causadores de doenças que podem provocar a morte das mudas e/ou servir como fonte de inóculo para

disseminação de patógenos durante o transplante. Existem diversos métodos disponíveis como solarização e tratamento com vapor de água (SILVA et al., 2001). Na etapa inicial são usadas bandejas com 98 células, com capacidade de 30 cm<sup>3</sup> (Figura 5A) para manutenção das mudas por 45 dias.

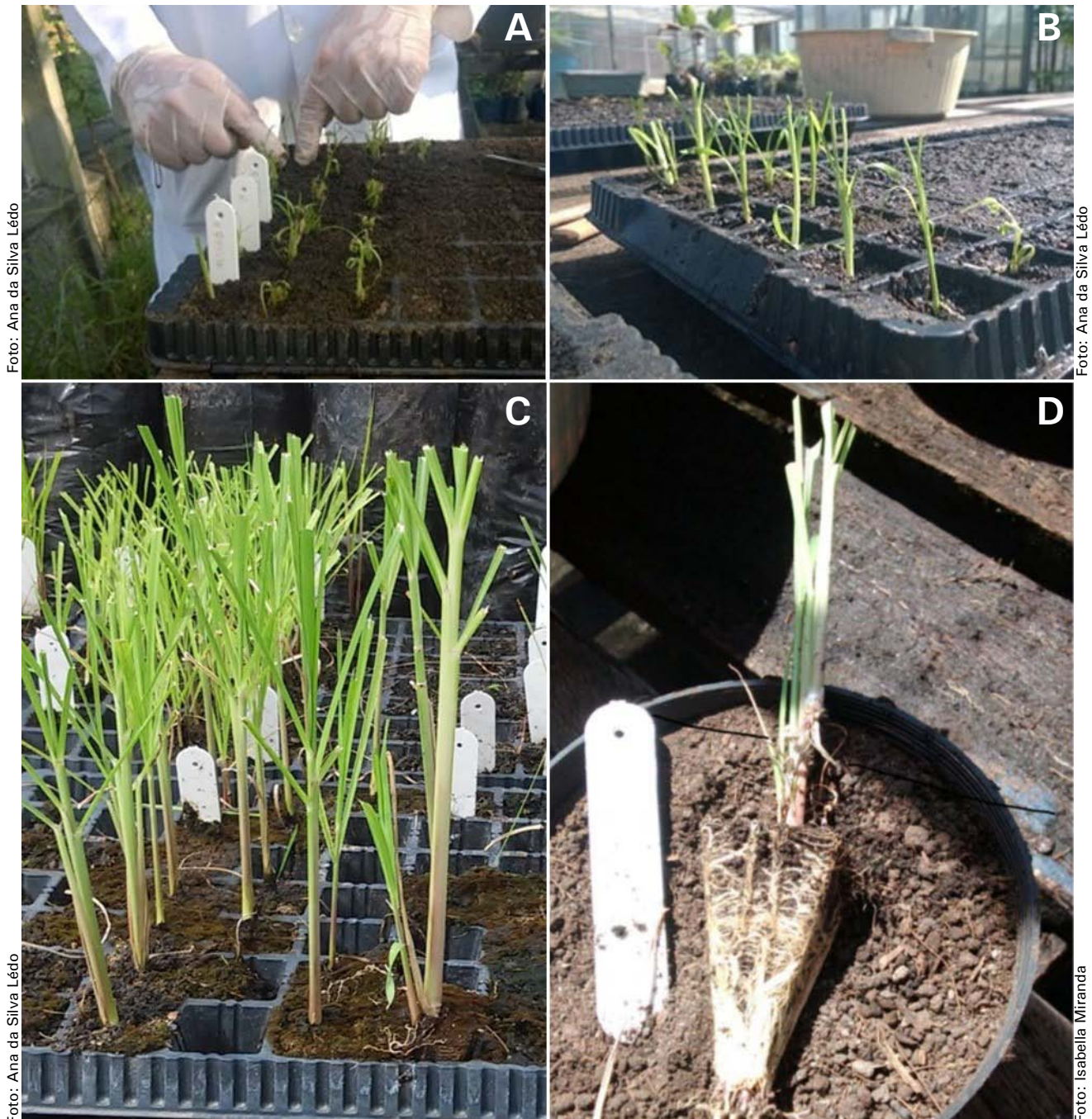


Foto: Ana da Silva Léo

Foto: Ana da Silva Léo

Foto: Ana da Silva Léo

Foto: Isabella Miranda

**Figura 5.** A) Mudanças de *Saccharum* sp prontas no telado para plantio definitivo; B) Plantio das mudas no campo.

## Considerações finais

A introdução de acessos por cultura de tecidos de plantas tem sido uma estratégia segura para programas de conservação e melhoramento genético de diversas espécies principalmente pela redução de custos de transporte, qualidade fitossanitária e facilidades durante a quarentena. Entretanto, devido às restrições de multiplicação dos materiais até sua liberação, muitas culturas perdem seu vigor. A adoção de práticas descritas na presente publicação nas etapas de multiplicação e aclimação de acessos do complexo *Saccharum* após quarentena permite a retomada da capacidade de multiplicação in vitro com a obtenção de mudas de qualidade com sobrevivência em campo.

## Agradecimentos

A Embrapa Labex Estados Unidos e USDA pela multiplicação e cessão dos acessos de *Saccharum* sp. e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial ao pesquisador Kazumitsu Matsumoto pela conservação in vitro dos acessos durante a quarentena.

## Referências

CARVALHO-NETTO, O. V.; BRESSIANI, J. A.; SORIANO, H. L.; FIORI, C. S.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, J. 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, n. 20, 2014. Disponível em: <<http://www.chembioagro.com/content/1/1/20>>. Acesso em: 01 jan. 2015.

DURÃES, F. O. M.; SUNDFELD, E.; SILVA, J. E. da. Fontes alternativas de energia e perspectivas do uso da agroenergia no mundo. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. de (Ed.). **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008.

COSTA, P. R. O.; DUARTE, F. S. A utilização da biomassa da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável aplicada no setor sucroalcooleiro. **Revista de Administração da Fatea**, v. 3, n. 3, p. 102-107, 2010.

JALAJA, N. C.; NEELAMATHI, D.; SREENIVASAN, T. V. **Micropropagation for quality seed production in sugarcane**. Rome: FAO/APCoAB; APAARI, 2008. 47 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 437-497, 1962.

NOGUEIRA, G. F. **Regeneração, conservação in vitro e estabilidade genômica em cana-de-açúcar**. Lavras, 2013. 184 p. Tese (Doutorado) Fisiologia Vegetal - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, J. B. C.; OLIVEIRA-NAPOLEÃO, I. T.; LL FALCÃO, L. L. Desinfestação de substratos para produção de mudas, utilizando vapor de água. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 2, p.155-158, 2001.

### Comunicado Técnico, 153

Embrapa Tabuleiros Costeiros  
Endereço: Avenida Beira Mar, 3250, CP 44,  
CEP 49025-040, Aracaju - SE.

Fone: (79) 4009-1344

Fax: (79) 4009-1399

[www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)

[www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF

1ª edição

On-line (2015)



### Comitê de publicações

Presidente: Marcelo Ferreira Fernandes

Secretária-executiva: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues

Membros: Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, João Costa Gomes, Josué Francisco da Silva Junior, Julio Roberto Araujo de Amorim, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo.

### Expediente

Supervisora editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues

Tratamento das ilustrações: Raquel F. de A. Rodrigues

Editoração eletrônica: Raquel F. de A. Rodrigues