

Avaliação do efeito do fungicida sistêmico cerconil sobre a regeneração e micropropagação, visando a eliminação dos fitorreguladores utilizados para clonagem de cana-de-açúcar.

Rivas, Rebeca¹; Alves, Gilberto Dias¹; Silva, Karime Soares da²; Dias, André Luís de França¹; Houllou-Kido, Laureen Michelle³

¹Universidade de Pernambuco (UPE) – Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Av. Agamenon Magalhães, s/n – Santo Amaro – Recife/PE CEP 50100-010 fone (81) 3416.4000, email: rebecarivas@gmail.com, alvesgd@icb.upe.br, andreluisfd@hotmail.com; ²Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Agronomia, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos - Recife/PE CEP 52171-900 Fone (81) 3320.6011, email: karyagronomia@hotmail.com; ³Pesquisadora da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) – Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Biologia Molecular, Av. Gen. San. Martin, 1371 – Bonji, CEP 50761-000 – Recife/PE Caixa Postal: 1022, fone (81)2122.7200, email: laureenhk@yahoo.com.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene de grande importância econômica, pois é cultivada em mais de 80 países de clima tropical e subtropical (http://encarta.msn.com/text_761573379_1/Sugarcane.html). Uma alternativa para a propagação de cana é a micropropagação *in vitro* que permite a redução do tempo e do espaço necessário para a propagação. Além disso, podem-se obter plantas livres de vírus, clones a partir de um indivíduo inicial (Grattapaglia e Machado, 1998).

A micropropagação vem sendo utilizada há décadas, apesar dos custos elevados (IAEA, 2004). O alto custo da micropropagação está diretamente correlacionado com consumo de energia elétrica, mão-de-obra, equipamentos e compostos químicos (IAEA, 2004). Dentre os componentes do meio de cultura, os mais caros são os fitorreguladores, como exemplo, o grama do BAP e do KIN custam R\$ 178,00 e R\$ 364,00 respectivamente. Sendo assim, a identificação de substâncias alternativas que possam substituir os fitorreguladores é uma alternativa para minimizar os custos da micropropagação, ampliando a utilização desta metodologia para fins comerciais e de pesquisa.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do fungicida sistêmico Cerconil PM, cujos princípios ativos são o clorotalonil (500 g.Kg⁻¹) e o tiofanato metílico (200 g.Kg⁻¹), na indução de regeneração *in vitro* da cana-de-açúcar (cv. RB932520).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Biologia Molecular da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). Foram utilizadas gemas axilares de cana de açúcar da cultivar RB932520 mantidas *in vitro*.

As gemas axilares foram inoculadas em seis meios diferentes, com a composição básica: sais e vitaminas de MS (Murashigue & Skoog, 1962), sacarose 20g.L⁻¹, inositol 0,1g.L⁻¹ e glicina 0,002g.L⁻¹, ágar 9g.L⁻¹. Estes meios foram elaborados com diferentes doses de Cerconil (Tabela 1). O controle correspondeu ao meio de cultura padrão para micropropagação de cana. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 20 repetições em cada tratamento, sendo 10 frascos com dois explantes/frasco.

Tabela 1. Componentes que diferem os 6 meios de cultura no experimento.

Tratamentos	Composição
0	Ausência de fitorregulador e fungicida
1	Cerconil 0,2 mg.L ⁻¹
2	Cerconil 0,4 mg.L ⁻¹
3	Cerconil 0,8 mg.L ⁻¹
4	Cerconil 1,0 mg.L ⁻¹

Após 30 dias, foi montado um segundo experimento, porém este sendo líquido, (ausência de ágar), e composto apenas pelo tratamento 3 (cerconil 0,8 mg.L⁻¹) e pelo 5 (BAP 0,2 mg.L⁻¹ e KIN 0,1 mg.L⁻¹), apresentando delineamento experimental inteiramente casualizado com 20 repetições em cada tratamento, sendo 10 frascos com dois explantes/frasco.

Ambos os experimentos (sólido e líquido) foram avaliados a cada oito dias observando os seguintes parâmetros: presença/ausência de brotação, número de brotos, presença/ausência de necrose, nível de necrosamento numa escala de 0-5, morte do explante, presença/ausência de raiz. Os valores do nível de necrosamento foram transformadas segundo a raiz quadrada de X+0,5, onde X significa o valor do nível de necrosamento. Os resultados foram analisados estatisticamente usando análise de variância (ANOVA) pelo teste de Duncan com o auxílio do programa ASSISTAT versão 7.4 beta (2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que os explantes mantidos no meio 3 (Cerconil 0,8 mg.L⁻¹), apesar de não apresentar diferença significativa com o tratamento 4 (8 dias de cultivo) e entre os tratamentos 2 e 4 (com 15 dias de cultivo), emitiram um número maior de novas brotações que os explantes mantidos nos demais meios de cultura testados. Resultado similar foi observado no experimento com meio líquido. Este resultado indica que o fungicida Cerconil pode induzir a emissão de novos ápices caulinares tanto em meio líquido como em meio semi-sólido.

A porcentagem de explantes emitindo novas brotações aumentou conforme aumentou a concentração do fungicida tanto aos 8 dias como aos 15 dias de cultivo (Tabela 2), com exceção do tratamento 4 que apresentou menor porcentagem comparado ao tratamento 3 (com 8 dias de cultivo). Segundo Moreira (1993), conforme o aumento da concentração do fungicida benomil elevava o número de brotos de *Citrus sunki*. Ramos *et al.* (1996), observaram que o número de brotos era reduzido conforme eram aumentadas as doses de benomil.

Tabela 2. Média de brotos, porcentagem de brotação, média do nível de necrosamento e porcentagem de enraizamento referentes aos 8^o e 15^o dias de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar (RB932520)

Dia	Tratamento	Média de brotos	Brotação (%)	Média do nível de necrosamento	Enraizamento (%)
8	0	1,25 BC ¹	45	1,62 AB	10
	1	0,95 BC	45	1,66 AB	30
	2	1,60 BC	65	1,56 AB	40
	3	2,95 A	75	1,62 AB	45
	4	2,05 AB	70	1,50 B	10
15	5	0,55 C	40	1,68 A	0
	0	1,60 BC	55	1,64 B	30
	1	1,20 C	50	1,67 B	55
	2	2,05 AB	70	1,58 B	65
	3	3,30 A	75	1,71 B	75
	4	2,80 AB	85	1,62 B	35
	5	1,00 C	55	1,93 A	0

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade

Não foi observado aumento de necrosamento dos tecidos devido à presença do fungicida, comparando-se o meio-padrão de cana com os meios suplementados com Cerconil (8 dias de tratamento). No entanto, após 15 dias de cultivo, o maior nível de necrosamento foi observado no tratamento 5 (meio-padrão de cana) que se diferenciou estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 2). A produção de polifenóis é responsável pela diminuição do desenvolvimento *in vitro*; sendo assim, qualquer redução no nível de necrosamento pode ser benéfica ao longo do processo de clonagem.

O enraizamento foi observado nos tratamentos com cerconil e com ausência de fitorreguladores e fungicida, porém, no meio-padrão de cana, apresentou inibição na indução de raiz. A porcentagem de enraizamento aumentou conforme era aumentada a concentração de Cerconil no meio de cultura até o nível de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ (tratamento 3). Silva *et al.* (2002) observaram que o aumento das concentrações de BAP inibia o enraizamento em abacaxizeiro. Dentre os tratamentos com cerconil, o tratamento 3 apresentou maior porcentagem de enraizamento tanto com 8 (45%) quanto com 15 (60%) dias de cultivo (Tabela 2). Em contradição, Salgado *et al.* (2001) mostraram que o fungicida benomil tem pouca eficiência na indução de raiz em *Dendranthema morifolium*.

Na figura 1, é possível observar a diferença de desenvolvimento entre os explantes provenientes dos tratamentos 0, 3 e 5.



Figura1. Explantes de cana-de-açúcar (cv. RB932520) provenientes dos tratamentos 0 (ausência de fitorreguladores e fungicida), 3 (Cerconil $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$) e 5 (BAP $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e KIN $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) com 15 dias de cultivo. É possível observar a presença de raiz no tratamento 3.

Com relação ao experimento 2, foi selecionado o tratamento que mais apresentou resultados positivos. Neste caso, o tratamento 3 (Cerconil $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$), e foi comparado com o meio-padrão de micropropagação de cana, sendo agora o meio líquido que é o mais recomendado para a cana-de-açúcar.

Com relação ao número médio de brotos, o tratamento 3 líquido apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tratamento 5 líquido (meio-padrão de cana) tanto com 8 dias (1,90 e 0,75 respectivamente) quanto com 15 dias (4,05 e 2,30 respectivamente) de cultivo.

A média de brotos do tratamento 3 líquido foi maior quando comparado ao tratamento 3 sólido (Figura 2), o mesmo é observado com relação ao tratamento 5 (BAP $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e KIN $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). Este resultado reafirma o efeito do Cerconil na indução de novas brotações em cana-de-açúcar (cv. RB932520).

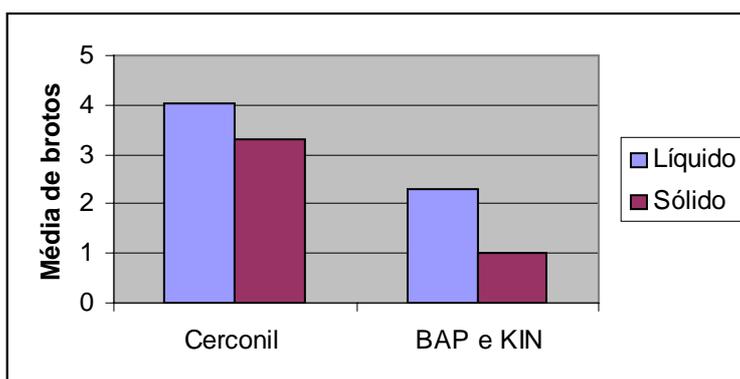


Figura 2. Comparação da média de brotos dos explantes de cana de açúcar (cv. RB932520) provenientes dos tratamentos 3 (Cerconil 0,8 mg.L⁻¹) e 5 (meio-padrão de cana) com relação aos experimentos líquido e sólido com 15 dias de cultivo.

A porcentagem de brotação do tratamento 3 líquido foi maior tanto com 8 dias (65%) quanto com 15 dias (85%) de cultivo com relação ao meio-padrão de cana (tratamento 5 líquido). O tratamento 3 líquido com 15 dias de cultivo apresentou maior porcentagem do que o experimento 3 sólido com o mesmo tempo de cultivo (Figura 3), assim como o tratamento 5 líquido obteve maior porcentagem de brotação comparado ao tratamento 5 sólido (Figura 3).

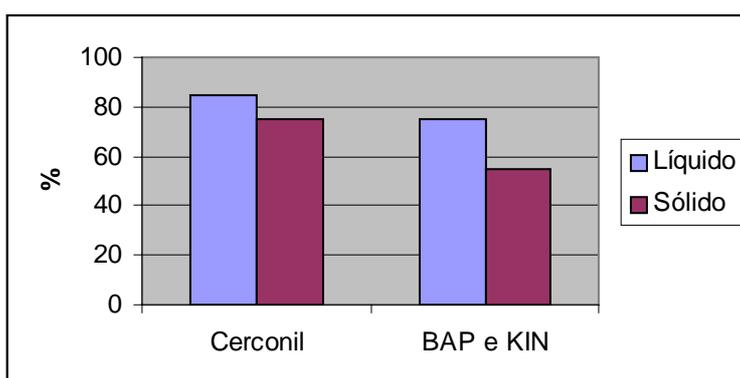


Figura 3. Comparação da porcentagem de brotação dos explantes de cana de açúcar (cv. RB932520) provenientes dos tratamentos 3 (Cerconil 0,8 mg.L⁻¹) e 5 (meio-padrão de cana) com relação aos experimentos líquido e sólido.

No experimento-líquido, a necrose dos tecidos não apresentou diferença significativa.

O tratamento 5 tanto no experimento líquido quanto sólido apresentou inibição no enraizamento. Já o tratamento 3 apresentou indução de raiz, com 8 dias de cultivo apresentou 20% de enraizamento e com 15 dias 40% com relação ao experimento sólido. É possível que o outro componente de ação fungicida (clorotalonil), presente na composição do Cerconil tenha influenciado a indução de desenvolvimento do sistema radicular.

É visível a redução dos custos da micropropagação de cana-de-açúcar com relação aos fitoreguladores mesmo utilizando uma concentração de Cerconil (0,8 mg.L⁻¹) quatro vezes maior que a do BAP (0,2 mg.L⁻¹). O pacote (1kg) de Cerconil PM custa R\$ 25,74 (valor fornecido pela MF Rural), portanto o grama custa R\$ 2,57 x 10⁻² que representa 6.926 vezes mais barato que o grama do BAP e 14.163 vezes mais barato que o grama do KIN.

CONCLUSÃO

O fungicida sistêmico Cerconil é uma substância alternativa de baixo custo viável para indução de novas brotações *in vitro* de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, v. 1, p. 183-260. 1998.

IAEA, **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**, Vienna, 2004. 102 p.

MOREIRA, M. A. **Efeitos do Benomyl e do Ácido Indolbutírico na propagação *in vitro* do porta enxerto *Citrus sinki* Hort. ex. Tan.** Lavras: ESAL, 1993. 56p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 4, p. 473-497, 1962.

RAMOS, J. D. *et al.* Efeito do triadimenol e da benzilaminopurina na multiplicação de brotos "*in vitro*" do porta-enxerto "Sunki". *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 43, n. 246, p.147-156, 1996.

SALGADO, S. M. L. *et al.* Efeito da utilização de TDZ e Benomyl na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 2, 2001.

SILVA, A. B. *et al.* Influência da Benzilaminopurina e do Benomyl na proliferação *in vitro* do abacaxizeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 6, p. 1190-1196, 2002.

Sugarcane. Microsoft® Encarta® Online Encyclopedia 2007. Disponível em: http://encarta.msn.com/text_761573379_1/Sugarcane.html Acesso em 28 de março de 2007.

PALAVRAS-CHAVE

Saccharum spp., cultivo *in vitro*, baixo custo, análogo do fitorregulador

¹

¹ Agradecimentos: FACEPE, IPA e UPE.