

PROTOCOLO DE ASSEPSIA PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE CANA DE AÇÚCAR

Data de aceite: 01/02/2024

Ana Hellen Oliveira Tavares

Pontifícia universidade católica do Paraná-
PUC-PR
Iracema do Oeste, Paraná, Brasil

Juliana Claudia Grings Rossato

Pontifícia universidade católica do Paraná-
PUC-PR
Palotina, Paraná, Brasil

Sara Gabrieli Zancanella

Pontifícia universidade católica do Paraná-
PUC-PR
Mercedes, Paraná, Brasil

relação às técnicas convencionais, além da obtenção de mudas de excelente qualidade fitossanitária e geneticamente idênticas ao material de origem. Dessa forma este trabalho teve como objetivo testar três protocolos de assepsia em meristema apical de cana-de-açúcar a fim de obter plantas micropropagadas. O experimento foi realizado no laboratório de Biotecnologia da PUC-PR, campus Toledo. Para a realização do experimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado contendo três tratamentos com 10 repetições cada. Os tratamentos testados foram: T1 (tríplice lavagem em água destilada, álcool 70% por 2 minutos, 2% hipoclorito de sódio (NaClO) durante 15 minutos, 1,5% de ácido cítrico por 5 minutos); T2 (álcool 70% por 30 segundos por três vezes, imersão em água destilada, 2% de NaClO durante 15 minutos, 1,5% de ácido cítrico por 3 minutos); T3 (tríplice lavagem em água destilada, álcool 70% por 1 minuto, 2% de NaClO durante 15 minutos, 2,5% fungicida mancozeb por 15 minutos). Todos os meristemas foram inoculados em meio MS + carvão ativado (2g.L⁻¹), e mantidos em sala de crescimento (25°C) no escuro por 15 dias. O tratamento 2 promoveu melhor resultado (40 % de explantes sadios).

RESUMO: A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tem grande importância econômica na agricultura no Brasil e, mais recentemente, com a utilização do etanol em escala mundial, torna-se ainda mais relevante. A forma mais utilizada para a obtenção de mudas dessa espécie é a partir de segmentos de colmos. No entanto, um problema muito recorrente nessa forma de propagação é a disseminação de doenças. Uma ferramenta que pode ser utilizada a fim de minimizar isso é a micropropagação, técnica considerada uma alternativa vantajosa para a multiplicação de plantas, devido à economia de tempo em

Porém, essa porcentagem é considerada um valor baixo, com isso novos testes deverão ser realizados para aumentar a porcentagem de explantes saudáveis.

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharum officinarum* L, propagação, meristema apical.

ASEPSY PROTOCOL FOR SUGAR CANE MICROPROPAGATION

ABSTRACT: Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) has great economic importance in agriculture in Brazil and, more recently, with the use of ethanol on a global scale, it becomes even more relevant. The most commonly used way to obtain seedlings of this species is from stem segments. However, a very common problem in this form of propagation is the spread of diseases. A tool that can be used to minimize this is micropropagation, a technique considered an advantageous alternative for the multiplication of plants, due to the time savings compared to conventional techniques, in addition to obtaining seedlings of excellent phytosanitary quality and genetically identical to the source material. Therefore, this work aimed to test three asepsis protocols in sugarcane apical meristem in order to obtain micropropagated plants. The experiment was carried out in the Biotechnology laboratory at PUC-PR, Toledo campus. To carry out the experiment, a completely randomized design was used, containing three treatments with 10 replications each. The treatments tested were: T1 (triple washing in distilled water, 70% alcohol for 2 minutes, 2% sodium hypochlorite (NaClO) for 15 minutes, 1.5% citric acid for 5 minutes); T2 (70% alcohol for 30 seconds three times, immersion in distilled water, 2% NaClO for 15 minutes, 1.5% citric acid for 3 minutes); T3 (triple washing in distilled water, 70% alcohol for 1 minute, 2% NaClO for 15 minutes, 2.5% mancozeb fungicide for 15 minutes). All meristems were inoculated in MS medium + activated charcoal (2g.L⁻¹) and kept in a growth room (25°C) in the dark for 15 days. Treatment 2 promoted the best result (40% of healthy explants). However, this percentage is considered a low value, so new tests must be carried out to increase the percentage of healthy explants.

KEYWORDS: *Saccharum officinarum* L, propagation, apical meristem.

1 | INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tem grande importância econômica na agricultura no Brasil e, mais recentemente, com a utilização do etanol em escala mundial, torna-se ainda mais relevante. A propagação convencional desta espécie é realizada a partir de segmentos de colmos provenientes de plantas do campo, após o primeiro ou segundo ano de plantio. Porém, novas variedades estão continuamente sendo desenvolvidas e sua disponibilização pode ser acelerada por meio da biotecnologia, via micropropagação (OLIVEIRA et al., 2010).

Na cana-de-açúcar, diversos estudos têm demonstrado que o tecido mais adequado para a micropropagação é o meristema apical, oriundo de perfilho jovens, com grande vigor e crescimento, e que sejam removidos de colmos de tamanhos variando entre vinte e oitenta centímetros (CIDADE et al., 2006).

Uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas

por fatores genéticos, as necessidades para seu cultivo in vitro também tendem a ser únicas. A capacidade de regeneração e crescimento in vitro parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta-matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (SILVA et al., 2012).

O tamanho do explante utilizado depende essencialmente do objetivo da micropropagação. Caso se pretenda eliminar algum microrganismo sistêmico como vírus, bactéria ou micoplasma, deve-se considerar, evidentemente, que quanto menor o explante isolado, ou quanto mais isolado este tecido estiver das regiões subjacentes vascularizadas, maiores serão as chances de sucesso (GRATTAPAGLIA e MACHADO et al., 1998).

O principal objetivo da fase de multiplicação é produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos importantes devem ser considerados. Não basta conseguir altas taxas de multiplicação em alguns explantes, o importante é obter uma taxa média satisfatório com o mínimo de variação de explante para explante (LEE et al., 1984).

O verdadeiro desafio, está no material vegetal e na sua manipulação antes de excisar o explante inicial, e em todos os passos até o transplântio da planta produzida. Esta manipulação inclui: manejo da planta-matriz, as características do explante utilizado, o procedimento de sub cultivo adotado, as condições ambientais e micro ambientais dentro do frasco de cultura e o transplântio.

Depois de isolados e inoculados em meio de cultura apropriado, os meristemas apicais de cana-de-açúcar se desenvolvem dando origem às plântulas que serão então multiplicadas, enraizadas e aclimatizadas (LIMA et al., 2001).

A justificativa é estabelecer um protocolo de micropropagação de cana-de-açúcar. A técnica de propagação desta espécie por meio de meristema apical é considerada uma alternativa vantajosa para a multiplicação de diversas variedades, devido à economia de tempo em relação às técnicas convencionais, além da obtenção de mudas de excelente qualidade fitossanitária e geneticamente idênticas ao material de origem (VIEIRA et al., 2009).

O problema mais recorrente é as doenças da cana que são de caráter sistêmico, portanto facilmente disseminadas pelas canas usadas nos plantios. A importância das doenças é de difícil quantificação, pela diversidade das cultivares e das condições ambientais em que são exploradas. Como uma doença é produto da interação patógeno-hospedeiro-ambiente, seus efeitos podem variar de um local para outro. Outro fator importante é a baixa quantidade de matéria propagativo com qualidade fitossanitária, para a ampliação da produção.

Dessa forma este trabalho teve como objetivo testar três protocolos de assepsia em meristema apical de cana-de-açúcar a fim de obter plantas micropropagadas.

2 I MATERIAIS E MÉTODOS

Para todas os protocolos foram coletados colmos em uma área rural no município de Mercedes-PR e destes foram retirados os palmitos com aproximadamente 5 cm de comprimento, depois foram cortados em cubinhos. O corte e a desinfestação foram realizados fora da câmara de fluxo, os outros processos foram realizados dentro.

PROTOCOLO I

Os explantes receberam a desinfestação com um tríplice lavagem em água destilada, depois foi realizado a imersão em álcool 70% por 2 minutos, depois em hipoclorito de sódio (2%) por 15 minutos. Posteriormente, o meristema foi imerso por 5 minutos na solução de ácido cítrico a 1,5%, para evitar sua oxidação. Os explantes foram transferidos e inoculados para frascos de vidro autoclavados e esterilizados contendo meio de cultura MS+carvão, onde recebeu quatro meristemas do mesmo genótipo em sua superfície, depois foi vedado com papel alumínio e plástico filme, após todo o processo foram mantidos no escuro por 15 dias (DUTRA et al., 2011).

PROTOCOLO II

Os explantes receberam a desinfestação com álcool, foram lavados em álcool 70% durante 30 segundos, por três vezes sem reutilização das soluções, depois foi imerso em água destilada. Depois em hipoclorito de sódio (2%) por 15 minutos, depois no ácido cítrico 1,5% por 3 min.

Após a retirada do excesso de solução de ácido cítrico dos cubos meristemáticos. Os explantes foram transferidos e inoculados para frascos de vidro autoclavados e esterilizados contendo meio de cultura MS+carvão, onde recebeu quatro meristemas do mesmo genótipo em sua superfície, depois foi vedado com papel alumínio e plástico filme, após de todo o processo foram mantidos no escuro por 15 dias (MELO et al., 2020).

PROTOCOLO III

Os explantes receberam tríplice lavagem em água destilada para a desinfestação, depois foram mergulhados em álcool 70% por 1 minuto, depois foi previamente mergulhado em solução de hipoclorito de sódio (2%) por 15 minutos.

Na desinfestação os explantes foram imersos por 15 minutos no fungicida mancozeb, foi usado 2,5g e diluído em 30ml de água. Os explantes foram transferidos e inoculados para frascos de vidro autoclavados e esterilizados contendo meio de cultura MS+carvão, onde recebeu quatro meristemas do mesmo genótipo em sua superfície, depois foi vedado com papel alumínio e plástico filme, após de todo o processo foram mantidos no escuro por 15 dias (FARIA et al., 2010).



Figura 1- Frascos contendo meristemas de cana-de-açúcar inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), em sala de crescimento do laboratório de Biotecnologia, PUC- Campus Toledo, 2021. Fonte: as autoras, 2021.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após 15 dias foi realizada a avaliação dos protocolos, verificando a oxidação, a presença de fungos, bactérias e também os explantes saudáveis conforme tabela 1.

PROTOCOLO	% SADIOS	% CONTAMINAÇÃO		%OXIDAÇÃO	CONTAMINAÇÃO POR 2
		FÚNGICA	BACTERIANA		
1	10	20	0	50	BACTERIA + OXIDAÇÃO 20
2	40	20	10	10	FUNGO + OXIDAÇÃO 10 BACTERIA + OXIDAÇÃO 10
3	20	10	30	40	

Tabela 1- Porcentagem de explantes de cana-de-açúcar saudáveis, contaminados (fungos ou bactérias) e oxidados submetidos a três protocolos de assepsia. Toledo, 2021.

O maior problema foi a contaminação dos explantes, devido ao manuseio da planta no campo. O instrumento que foi utilizado para cortar a cana mesmo limpo no álcool, pode estar contaminado e no laboratório o bisturi mesmo sendo novo também pode estar contaminado e o manuseio incorreto do explante na câmara de fluxo também pode causar esse problema. Mesmo com a desinfestação dos protocolos, todos os protocolos tiveram oxidação, o que teve o melhor resultado nesse aspecto foi o protocolo 2.

Teve também a contaminação fúngica e bacteriana devido ao material utilizado, que provavelmente veio do campo com essa contaminação. O protocolo que teve o melhor resultado nesse aspecto foi o protocolo 3, devido ao uso do fungicida Mancozeb no procedimento.

Tivemos o maior cuidado no transporte e na execução dos protocolos. Mas o sucesso do cultivo *in vitro* e da introdução de um determinado genótipo nos programas de melhoramento utilizando a seleção *in vitro*, depende das condições de cultivo do meio de cultura, do estado fisiológico da planta mãe de onde é retirado o explante e, sobretudo, da capacidade do genótipo doador do explante de induzir calos embriogênicos e de sua posterior regeneração em plantas. A fonte de carbono adicionada ao meio de cultura influí significativamente o desempenho do cultivo, devido aos seus efeitos sobre o aporte de energia para o explante e a manutenção do potencial osmótico do meio (RIBEIRO et al.,2015).

Mesmo sendo um material de difícil manuseio, de fácil oxidação e com problemas com bactérias e fungos, tivemos também resultados positivos com explantes saudáveis que foram colocados na luz para o seu desenvolvimento. O tratamento que obteve o melhor resultados foi o 2.



Protocolo 1



Protocolo 2



Protocolo 3

Figura 2: Imagens de frascos contendo meristemas de cana-de-açúcar submetidos a três protocolos de assepsia. Toledo, 2021. Fonte: as autoras, 2021.

4 | CONCLUSÃO

O protocolo II no qual o usou a desinfestação com álcool 70% durante 30 segundos, por três vezes sem reutilização das soluções promoveu melhor resultado para a descontaminação de explantes de cana-de-açúcar. Porém, 40% de explantes sadios pode ser considerado um valor baixo, com isso novos testes deverão ser realizados para aumentar a porcentagem de explantes sadios.

REFERÊNCIAS

- CIDADE, D. A. de P; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, n. 3, p. 385-391, mar. 2006.
- DUTRA, L. F. Protocolo de Micropropagação de Cana-de-açúcar. EMBRAPA Pelotas, RS. Dezembro, 2011. Acesso em: 12 de novembro de 2021. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/67353/1/Circular-128.pdf>
- FARIA, P, R. Micropropagação de variedades de cana-de-açúcar. Instituto de Ciências Biológicas – ICB, 2010. Acesso em: 12 de novembro de 2021. Disponível em: <https://projetos.extras.ufg.br/conpeex/2011/mestrado/mestrado-paulo-roberto.pdf>
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. J. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação de plantas. Brasília: Embrapa – SPI / CNPH, 1998. v.1, p.183-260.
- LIMA, M. A. C; GARCIA, R. O.; MARTINS, G. S.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (Saccharum officinarum L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 73-77, mar. 2001.
- LEE, T. S. G.; BACCHI, O. O. S. Improved rooting of differentiated shoots from sugarcane callus tissue, Turrialba, v. 34, n.4, p. 481-484, 1984.

MELO, B. L. Regeneração e Multiplicação in vitro de células meristemáticas de cana-de-açúcar. BRD. COMPLETA.vol.10, n.01, jan.jun-2020

OLIVEIRA, A. L. B.; FERREIRA, L. T.; HERCULANO, L.; OLIVEIRA, R. A.; PEREIRA, J. A. F.; CAMARA, T. R. Ação do hipoclorito na assepsia de explantes de cana-de-açúcar para embriogênese somática. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE, 10., 2010, Recife. Anais... Recife: Editora da UFRPE, 2010. JEPEX. R0720-1.

RIBEIRO, M.F.; RITTERBUSCH, C.W.; BIANCHI, V.J.; PETERS, J.A. Fontes de carbono na multiplicação in vitro de porta-enxertos de marmeleiro 'MC' e 'Adams'. Plant Cell Culture & Micropropagation, v.11, n.2, p.54-61, 2015.

SILVA, M. I. Embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo – AL, 86p, 2012.

VIEIRA, R. A.; SILVA, C. M.; SOUTO, E. R.; HATA, F. T.; MACHADO, M. F. P. S.; MARCUZ, F. S. Diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina e cinetina na micropropagação in vitro de variedades RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar. Campo Digital, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 122-126, 2009.