

Efeito do benzilaminopurina e da cinetina sobre potencial morfogênico de cana-de-açúcar

Joelson Germano Crispim¹, Mailson Monteiro Do Rêgo², Elizanilda Ramalho Do Rêgo³, Gláucia Dijoânia Azevedo Medeiros⁴, Wellington Dos Santos Soares⁵, Angela Maria Dos Santos Pessoa⁶

¹Graduando em Ciências Biológicas – Bolsista de iniciação Científica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba, *Campus* II, Cidade Universitária s/n, 58397-000, Areia, Paraíba, Brasil. e-mail: joelson@biologo.bio.br

²Biólogo, Doutor. Professor adjunto III, DCB/UFPB Areia, Paraíba, Brasil.

³Bióloga, Doutora, Professora associado I, Departamento de Ciências Fundamentais e Sociais, UFPB, Areia, Paraíba, Brasil.

⁴Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia, DCB/UFPB, Areia, Paraíba, Brasil.

⁵Biólogo, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

⁶Mestre, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia DCB/UFPB, Areia, Paraíba, Brasil.

Resumo

As primeiras cultivares de *S. officinarum* L. introduzidas no Brasil foram importadas da Índia durante o período colonial, sendo cultivadas na mesorregião do brejo paraibano, a exemplo de POJ Branca, as quais estão contaminadas por doenças e produzem pouco. A micropropagação de plantas possibilita a limpeza clonal e a multiplicação massal, em tempo e espaço reduzidos. Concentrações adequadas de fitorreguladores é fator limitante de desenvolvimento dos explantes cultivados *in vitro*. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do benzilaminopurina e da cinetina sobre potencial morfogênico do cultivar POJ Branca. Para tanto, utilizou-se como fonte de explante ápices caulinares de palmitos, os quais após serem desinfestados foram cultivados em meio Murashige e Skoog (MS) suplementado com nove diferentes combinações de benzilaminopurina (0,0; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹) e cinetina (0,0; 0,1 e 0,2 mg.L⁻¹). Após 14 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotações, comprimento das brotações laterais, matéria fresca e número de explantes necrosados. As interações entre BAP x KIN de todos os tratamentos mostraram-se significativas a 5% de probabilidade para as variáveis, matéria fresca, comprimento planta e número de explantes necrosados, sendo as combinações de BAP (1,0 mg.L⁻¹) e KIN (0,1 mg.L⁻¹) as mais adequadas, respectivamente, para maior número de brotos e maior teor de matéria fresca.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum* L., Micro-propagação, Citocininas, Fitormônios.

Abstract

Effect of benzylaminopurine and kinetin on morphogenic potential of sugar cane. The first cultivars of *S. officinarum* L. introduced in Brazil were imported from India during the colonial period, being cultivated in the mesoregion from Paraíba, like POJ-Branca. This cultivar is contaminated by diseases and showed low yield. The plant micropropagation enables cleaning of clonal and mass multiplication, in the reduced time and space. Adequate concentrations of plant growth regulators limiting factor of development *in vitro* cultured explants. In this context, the study aimed to evaluate the effect of benzylaminopurine and kinetin on the morphogenic potential from POJ-Branca variety. The explant was stem apices, which after being disinfected, were cultured on Murashige and Skoog (MS). The MS medium was supplemented with nine different combinations (treatments): benzylaminopurine (0.0, 0.5 and 1.0 mg.L⁻¹) and kinetin (0.0, 0.1 and 0.2mg.L⁻¹). After 14 days the following variables were evaluated: number of shoots, length of axillar shoots, fresh weight and number of necrotic explants. Interactions between BAP x KIN all treatments was significant at 5% for the variables, fresh weight, plant length and necrosis, with the interaction of 1.0 mg.L⁻¹ BAP and 0.1 mg L⁻¹ KIN and 0.1 mg L⁻¹ BAP and 0.1 mg L⁻¹ KIN. The combinations of BAP (1.0 mg.L⁻¹) and KIN (0.1 mg.L⁻¹) were the most suitable for both, greater number of shoots and greater fresh weight, respectively.

Keywords: *Saccharum officinarum* L., Micropropagation, Cytokinins, Phytohormones

Introdução

A *Saccharum officinarum* L. é uma das mais importantes culturas do

agronegócio brasileiro, em função da grande área plantada e seus produtos e subprodutos, particularmente açúcar e álcool. Nas últimas décadas observou-se



uma acentuada tendência de alta nos mercados dos seus derivados, devido à substituição gradativa do petróleo pelo álcool, à crescente conscientização da redução das reservas mundiais de petróleo e das mudanças climáticas causadas pelo efeito estufa (Cidade et al., 2006).

As primeiras cultivares introduzidas no Brasil foram importadas da Índia durante o período colonial, inclusive aquelas introduzidas na mesorregião do agreste paraibano, em particular no brejo, a exemplo de SP 791011, RB 813250, SP 931011, RB 791011, RB 98710, POJ BRANCA, POJ ROXA, RB 92579. Estas cultivares apresentam contaminação por patógenos sistêmicos, derivado do intenso cultivo prolongado (Silva et al., 1984). Este problema fitossanitário pode ser contornado através do processo de limpeza clonal a partir da cultura de meristemas apicais (George, 1993).

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, é a aplicação prática de maior impacto da cultura de tecidos, que tem como principal objetivo a limpeza clonal ou a aceleração dos métodos convencionais de propagação vegetativa (Grattapaglia e Machado, 1998). A micropropagação apresenta inúmeras vantagens quando comparado aos métodos de propagação vegetativa convencionais, dentre elas: multiplicação massal com rapidez, mudas de qualidade superior, redução em tempo e espaço (Malhotra, 1995). Aliado a isso, as mudas obtidas são de excelente qualidade fitossanitária, por serem cultivadas em ambiente controlado e asséptico, geneticamente uniformes e idênticas ao material vegetal de origem.

A aplicação dessa técnica depende de fatores associados à indução e ao controle de morfogênese quanto à regeneração de brotos e raízes no processo de organogênese (Flores, 2006). As citocininas são fitormônios que se caracterizam por promover a quebra da dominância apical e controle da divisão celular, aumentando a taxa de multiplicação por meio de brotações laterais relacionadas à atividade nos meristemas. Essas substâncias possuem grande influência no padrão de desenvolvimento de órgãos, tecidos e células vegetais. Na maioria das espécies, a presença de citocininas no meio

nutritivo potencializa a formação de brotações (George, 1993; Thorpe, 1993).

Uma série de compostos foram identificados com atividade de citocinínica, entre eles, os de ocorrência natural e vários derivados sintéticos como é o caso da Benzilaminopurina (BAP) e da cinetina (KIN) (Sakakibara, 2006). Hoje, sabe-se que o balanço correto desses reguladores de crescimento, assim como o fornecimento adequado de nutrientes, pode determinar o sucesso ou o fracasso de um cultivo em particular (Huang; Murashige, 1976).

Neste contexto, o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de protocolos *in vitro* quanto aos fitormônios podem implicar em melhores níveis de desenvolvimento dos explantes cultivados. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do benzilaminopurina e da cinetina sobre potencial morfogênico da variedade antiga de cana-de-açúcar (POJ Branca) cultivada na mesorregião do brejo paraibano.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, localizado no município de Areia, PB. O material vegetal utilizado foi a variedade POJ Branca, coletada de plantas matrizes com 10 meses de idade nos engenhos e em pequenas propriedades rurais situadas no município de Areia-PB, localizado na Mesorregião do Brejo Paraibano.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina, 100,0 mg.L⁻¹ de inositol, 20,0 g.L⁻¹ de sacarose e pH ajustado para 5,7±1 e nove diferentes combinações de BAP (0,0, 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹) e KIN (0,0, 0,1 e 0,2 mg.L⁻¹).

Como fonte de explantes foram utilizados ápices caulinares com cerca de 50mm comprimento. No processo de desinfestação os ápices foram inicialmente lavados em água corrente e detergente comercial, por 2 a 3 minutos. Em seguida, submetidos a um processo de desinfestação com hipoclorito de sódio (NaOCl) comercial a 0,6% (v/v), por 30 minutos; enxágue em água destilada e autoclavada, por três vezes; imersão em HgCl₂ a 0,02%

(v/v), por 15 minutos, e novos enxáguas com água autoclavada, por três vezes. Os ápices caulinares isolados e desinfetados foram inoculados em câmara de fluxo laminar em tubos de ensaio contendo 20 ml do meio MS e acondicionados em câmara de crescimento sob condições ideais. Após 14 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotações, comprimento das brotações laterais, peso de matéria fresca e número de explantes necrosados.

Adotou-se o delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial (3 x 3) (doses de BAP x KIN), com 10 repetições por tratamento. Os percentuais correspondentes foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias LSD, a 5% de probabilidade, desdobrado para as fontes de variação que apresentaram diferenças significativas a 5% de probabilidade na análise de variância e os dados quantitativos foram submetidos à análise de regressão. Para atender aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, os dados foram transformados para $(X + 0.5)^{1/2}$. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa GENES.

Resultados e Discussão

As interações entre BAP x KIN mostraram-se significativas em nível de 5% de probabilidade para a maioria das variáveis analisadas, exceto para número de brotações (Tabela 1). Na interação BAP x KIN nas concentrações de 1,0 e 0,1 mg.L⁻¹ observa-se uma tendência no aumento no peso de matéria fresca (Figura 1) e uma diminuição no número de brotos necrosados (Figura 2). Este fato possivelmente está relacionado com a utilização da concentração de BAP utilizada, pois ele está envolvido na quebra de dominância apical e no controle da divisão celular, particularmente as ciclinas (George, 1993; Pasqual, 2001), promovendo desse modo o surgimento e crescimento das brotações nas regiões meristemáticas. Vieira et al. (2009) reportaram que, na micropropagação de cana-de-açúcar, o maior ganho de massa fresca ocorreu quando eles adicionaram ao meio MS uma concentração dez vezes menor de BAP (0,1 mg.L⁻¹) e 0,1 mg.L⁻¹ de KIN.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para quatro características do potencial morfogênico da variedade de cana-de-açúcar POJ Branca. Areia, UFPB, 2013.

	Quadrados Médios			
	Número de brotos (%)	Comprimento dos brotos laterais (%)	Teor de matéria fresca (%)	Explantes necrosados (%)
BAP x KIN	11,42 ^{ns}	2,54*	0,24*	0,57*
C.V. (%)	61,82%	43,65%	79,30%	181,44%

*Significativo, em nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ns, não significativo

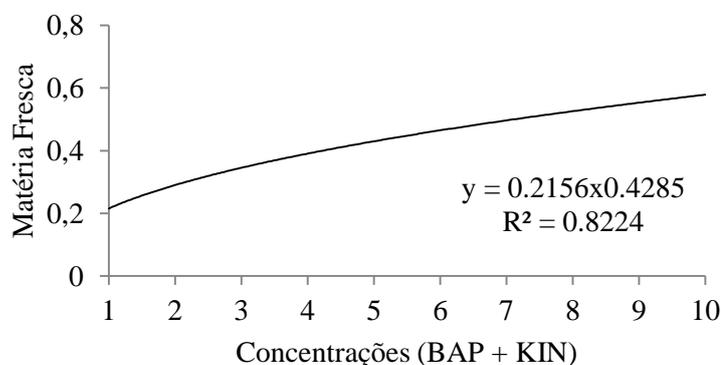


Figura 1. Influência de diferentes concentrações de BAP e Kin sobre o teor de Matéria Fresca UFPB/ CCA, Areia-PB, 2013.

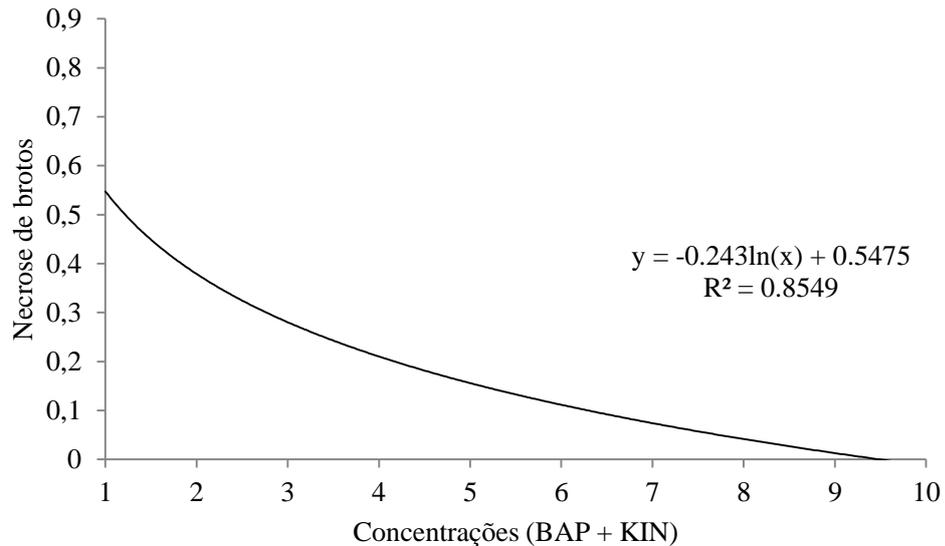


Figura 2. Influência de diferentes concentrações de BAP e Kin sobre o número de brotos necrosados UFPB/ CCA, Areia-PB, 2013

Para o crescimento de brotos laterais, o balanço ideal entre os fitorreguladores (BAP x KIN), destacou-se a combinação 1,0 BAP e 0,1 KIN (BAP + KIN=6) (Figura 3), proporcionando os maiores valores de comprimento das brotações e a partir dessa concentração o crescimento dos brotos diminuiu

regressivamente. Estes dados corroboram com os dados encontrados por Viera et al. (2009) onde utilizando meio suplementado com BAP, seja com 0,5 ou 1,0 mg L⁻¹, propiciou melhor desenvolvimento de brotações do que o meio sem adição de fitormônios.

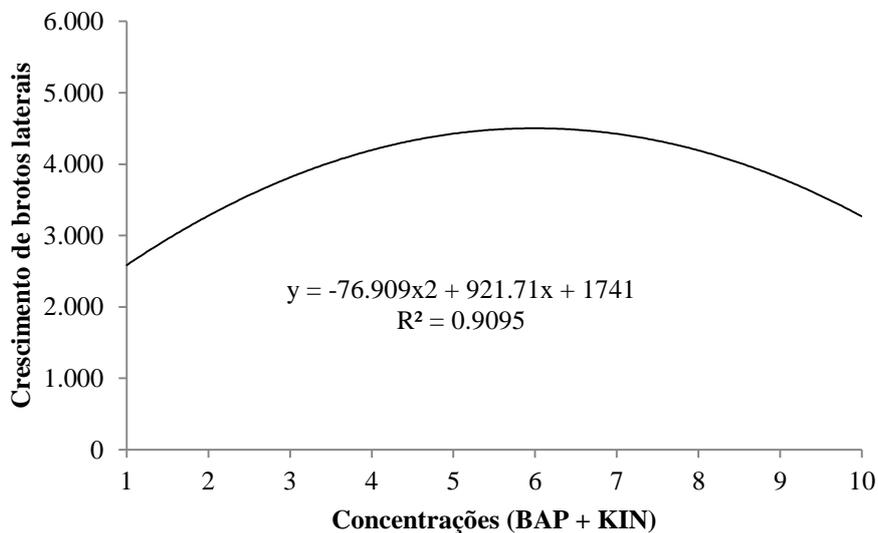


Figura 3. Influência de diferentes concentrações de BAP e Kin sobre o crescimento das brotações laterais UFPB/ CCA, Areia-PB, 2013.

Quando observado o efeito de BAP dentro dos níveis de KIN verificou-se que diferentes concentrações de BAP foi significativo quando se utilizou da concentração de KIN a 0,1 mg.L⁻¹.

Portanto, o aumento das concentrações de fitormônios no meio de cultura, não implicou necessariamente no melhor desenvolvimento das brotações, no entanto, a contribuição de diferentes concentrações

de BAP com KIN fixada 0,1 mg.L⁻¹, evidencia que a interação e o balanço de BAP e KIN tem efeito sob o desenvolvimento de brotos de cana-de-açúcar cultivados *in vitro*.

Esses resultados indicam que o meio suplementado com BAP, nas doses de 0,5 ou 1,0 mg.L⁻¹, propiciam melhor desenvolvimento de brotações do que o meio sem adição de fitorreguladores. Considerando o meio com concentração de KIN de 0,1 mg.L⁻¹, o BAP em concentração de 1,0 mg.L⁻¹ apresentou maior ganho de massa fresca quando comparado com a não-adição do BAP.

Conclusão

As combinações de BAP (1,0 mg.L⁻¹) e KIN (0,1 mg.L⁻¹) foram as mais adequadas, respectivamente, para a cultura de meristemas apicais e maior teor de matéria fresca para o cultivo *in vitro* da variedade POJ Branca.

Referências

- CIDADE, D. A. 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**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: biometria**. Vicosia: Imprensa Universitaria, 2006. 480 p.
- ERIC, A. C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G. R. L. 6- Benzilaminopurina e ácido indolburítico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.) cv. Tupy. **Ciência Rural**, 2002, v. 32, n. 5, p. 765-770.
- GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. Part 1 – The technology. 2nd Edition, Exegetics Limited, London, 1993. 574pgs.
- 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/CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.
- HUANG, L.; MURASHIGE, T. **Plant tissue culture media: major constituents, their preparation and some applications**. Rockville: Tissue Culture Association, 1976. (TCA Manual, v.3, n.1).
- LEMO, E. E. P., FERREIRA, M. S., ALENCAR, L. M. C., NETO, C. E. R., ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.
- LEE, T.S.G. Multiplication of sugarcane by apex culture. **Turrialba**, v.36, p.231-236, 1986.
- LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, p.197-200, 1998.
- MALHOTRA, S.D. Biotechnology and sugarcane. **International Sugar Journal**, v.97, p.160-163, 1995.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, 1962, v. 15, p. 473-497.
- REIS, V. M. et al. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 206, p. 205-211, 1999.
- ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; DA SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa': Efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2003, v. 25, n. 2, p. 365-367.
- SAKAKIBARA, H. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. **Annual Rev. Plant Biol.** 57:431-449, February 1, 2006.
- SILVA, H.; SILVA, A. Q.; DIAS, J. Q. Fermentação do caldo de seis variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Agropecuária Técnica**, vol. 5(1/2): 27-33. 1984.
- TAYLOR, P.W.J.; KO, H.L.; ADKINS, S.W.; RATHUS, C.; BIRCH, R.G. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding



- suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.28, p.69-78, 1999
- TAYLOR, P. W. J.; DUKIC, S. Development of an in vitro culture technique for conservation of *Saccharum* spp. hybrid germplasm. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 34: 217-222. 1993.
- VIEIRA, R. A. SILVA, C. M. SOUTO, E. R. HATA, F.T. MACHADO, M. F. S. P. MARCUZ, F. S. **Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação in vitro das variedades rb867515 e rb855156 de cana-de-açúcar.** Campo digital, Campo Mourão, V.4, N.1, P. 122-126, 2009.

