



DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA E CINETINA NA MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DAS VARIEDADES RB867515 E RB855156 DE CANA-DE-AÇÚCAR

RAFAEL AUGUSTO VIEIRA¹; CLAUDIO MEDEIROS DA SILVA²; ELIEZER RODRIGUES DE SOUTO¹; FERNANDO TERUHIKO HATA¹; MARIA DE FÁTIMA PIRES DA SILVA MACHADO¹; FERNANDA SANTOS MARCUZ¹.

¹Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Maringá, PR, Brasil. ²Faculdade Integrado de Campo Mourão, Curso de Agronomia. Endereço para correspondência: Rodovia BR-158, Km 207, s/n, CEP 87300-970, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: claudio@grupointegrado.br

RESUMO

A propagação *in vitro* de cana-de-açúcar é uma alternativa vantajosa em programas de melhoramento para a multiplicação de variedades, devido à economia de tempo em relação às técnicas convencionais, à excelente qualidade fitossanitária e à uniformidade genética das mudas. No entanto, para que o seu uso tenha viabilidade econômica, faz-se necessário otimizar as condições de cultivo para cada espécie ou variedade que se deseja multiplicar. Foram avaliadas nove diferentes associações de concentrações das citocininas BAP e KIN no cultivo *in vitro* de meristemas apicais da variedade RB867515 e nas brotações da variedade RB855156 de cana-de-açúcar. Verificou-se que os meios 5 (0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de KIN) e 6 (0,2 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de KIN) foram os mais adequados para a cultura de meristemas apicais de cana-de-açúcar da variedade RB867515, proporcionando melhor desenvolvimento. Para o ganho de massa fresca de brotações da variedade RB855156, a adição de BAP, seja de 0,1 ou 0,2 mg L⁻¹, no meio de cultura possibilitou maiores índices de ganho de massa fresca quando comparados ao meio sem adição de BAP.

Palavras-chave: cultura de tecidos vegetais, citocininas, fitohormônios.

DIFFERENT CONCENTRATIONS OF 6-BENZILAMINOPURIN AND CYNETIN *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF THE SUGARCANE VARIETIES RB867515 AND RB855156

ABSTRACT

In vitro propagation is a good alternative to multiply genotypes in sugarcane breeding programs because the short time to produce compared the traditional techniques, the sanity quality, and genetic uniformity. However, it is necessary to optimize protocols for each specie or variety. This work was the objective to evaluate nine different associations of concentrations of BAP and KIN for the apical meristems tissue culture of sugarcane variety RB867515 and sprouts explants of variety RB855156. The combinations of concentrations 5 (0,1 mg L⁻¹ BAP and 0,1 mg L⁻¹ KIN) and 6 (0,2 mg L⁻¹ BAP and 0,1 mg L⁻¹ KIN) were the best for apical meristems of RB867515. For sprouts explants of RB855156, to add BAP in 0,1 or 0,2 mg L⁻¹ to made possible higher fresh weight gain index than treatments without BAP.

Key words: plant tissue culture, citocinin, phytohormone.

INTRODUÇÃO

A micropropagação é a principal técnica de cultura de tecidos com potencial de utilização na agricultura (1,2). A aplicação da propagação *in vitro* de meristemas apicais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma alternativa vantajosa em programas de melhoramento para a multiplicação de variedades, devido à economia de tempo em

relação às técnicas convencionais (2). Aliado a isso, as mudas obtidas são de excelente qualidade fitossanitária, geneticamente uniformes e idênticas ao material vegetal de origem. Entretanto, para que o seu uso tenha viabilidade econômica, faz-se necessário otimizar as condições de cultivo para cada espécie ou variedade, seja com relação às condições de temperatura, fotoperíodo e

intensidade luminosa ou à composição de nutrientes no meio de cultura.

As citocininas são fitohormônios que se caracterizam por promover a quebra da dominância apical, aumentando a taxa de multiplicação por meio de brotações laterais relacionadas à atividade promovida nos meristemas. Segundo George & Sherrington (3), o crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos fitohormônios existentes no meio de cultura, principalmente citocininas e auxinas. Assim, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de protocolos *in vitro* quanto aos fitohormônios podem implicar em melhores níveis de desenvolvimento dos explantes cultivados.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho de meristemas apicais da variedade RB867515 e brotações da variedade RB855156 de cana-de-açúcar, em meio MS de Murashige & Skoog (4), suplementado com nove diferentes concentrações das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN), e aperfeiçoar o protocolo de micropropagação empregado na obtenção de mudas de cana-de-açúcar.

Tabela 1. Concentração de benzilaminapurina (BAP) e cinetina (KIN) nas diferentes associações testadas para o desenvolvimento de cana-de-açúcar.

Associações de concentrações (Meios de cultura)	BAP	KIN
	mg mL ⁻¹	
1	0,0	0,0
2	0,1	0,0
3	0,2	0,0
4	0,0	0,1
5	0,1	0,1
6	0,2	0,1
7	0,0	0,2
8	0,1	0,2
9	0,2	0,2

Para cada tratamento foram considerados, em média, 3 tubos de ensaio com um meristema cada, sendo que a comparação dos tratamentos foi realizada a avaliação visual do desenvolvimento dos meristemas nos tratamentos após 21 dias da inoculação no meio de cultura. Utilizou-se como critérios, o crescimento lateral e apical dos meristemas, tomando como base de comparação o desenvolvimento dos meristemas inoculados no meio padrão (meio 6 – testemunha), utilizado na cultura de tecidos da cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, utilizando colmos de cana-de-açúcar cedidos pela Usina de Álcool e Açúcar USASIGA, localizada em Cidade Gaúcha, Paraná.

Para o ensaio 1, as gemas da variedade RB867515 foram individualizadas, lavadas e submetidas ao processo de assepsia. Sob condições estéreis, os meristemas foram isolados em câmara de fluxo laminar e inoculados em tubos de ensaio contendo 7 mL do meio de cultura referente à cada tratamento. Os tratamentos consistiram de nove diferentes associações de concentrações das citocininas 6-benzilaminapurina (BAP) e cinetina (KIN). As associações são apresentadas na Tabela 1. A cultura *in vitro* foi realizada no meio MS regulado para o pH 5,8, suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de tiamina, 100,0 mg L⁻¹ de inositol, 20,0 g L⁻¹ de sacarose e das associações de concentrações testadas.

O ensaio 2 consistiu da inoculação de brotações micropropagadas *in vitro* nos tratamentos supracitados. O ensaio teve arranjo fatorial considerando BAP e KIN como fatores principais, constituídos por três níveis (concentrações de 0,0; 0,1 e 0,2 mg mL⁻¹). Adotou-se o delineamento inteiramente ao acaso com seis repetições por tratamento. As brotações micropropagadas da variedade RB855156 foram obtidas no meio 6, e aos 60 dias em câmara de crescimento, foram transferidas para meio de cultura desprovido de fitohormônios (Meio 1), onde permaneceram por 14 dias. Feito isso, os

brotos foram individualizados em câmara de fluxo laminar, pesados, e inoculados nos meios testados, regulados para o pH 4.0. Após 14 dias em câmara de crescimento, sob as mesmas condições especificadas para o ensaio 1, os explantes foram pesados novamente. A partir do peso inicial e final, foi calculado o percentual de ganho de massa fresca para cada repetição dos tratamentos. Os percentuais correspondentes foram submetidos à análise de variância no arranjo fatorial, considerando BAP, KIN e a interação entre BAP e KIN como fontes de variação, 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. Para atender aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias para a análise de variância, os dados foram transformados para $(x)^{0.5}$. As análises estatísticas foram realizadas por meio

do programa SAS versão 8.2 para Windows (5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, considerando os níveis de desenvolvimento atribuídos para os meios, foi observado que o aumento da concentração de BAP e KIN na cultura *in vitro* da cana-de-açúcar não apresentou relação direta com o desenvolvimento dos meristemas de cana-de-açúcar. Dessa forma, é possível inferir que o balanço das concentrações dos reguladores de crescimento é um fator relevante na morfogênese, e na multiplicação de meristemas de cana-de-açúcar. Os meios 5 e 6 apresentaram melhor desenvolvimento, sendo os mais recomendados para cultura de meristemas da variedade RB867515 (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação comparativa do crescimento lateral e apical dos meristemas apicais de cana-de-açúcar variedade RB867515 para as nove associações de citocininas avaliadas aos 21 dias de cultura *in vitro*¹.

Associações de concentrações (Meios de cultura)	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,2
	BAP + 0,0 KIN	BAP + 0,0 KIN	BAP + 0,0 KIN	BAP + 0,1 KIN	BAP + 0,1 KIN	BAP + 0,1 KIN	BAP + 0,2 KIN	BAP + 0,2 KIN	BAP + 0,2 KIN
	mg L ⁻¹								
Grau de desenvolvimento	Médio	Médio	Médio	Fraco	Bom	Bom	Fraco	Fraco	Fraco

¹ Para estabelecer o grau de desenvolvimento dos meristemas nos diferentes meios usou-se como base de comparação o desenvolvimento no meio 6 – testemunha.

No segundo experimento, a análise de variância indicou diferenças significativas ($P \leq 0,05$) para o efeito das diferentes concentrações de BAP e não evidenciou diferenças significativas para a KIN e para a interação entre BAP e KIN (Tabela 3). Desdobrando o efeito de BAP dentro dos níveis de KIN pôde-se verificar que o efeito de diferentes concentrações de BAP foi significativo quando se utilizou das concentrações de KIN de 0,0 e de 0,1 mg L⁻¹. Assim pôde-se inferir que o aumento das concentrações de fitohormônios no meio de cultura, não implicou necessariamente no melhor desenvolvimento das brotações, no entanto, a contribuição de diferentes concentrações de BAP quando a

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

Para amoreira-preta 'Tupy', o aumento da concentração da 6-benzilaminopurina até 5,1µM promoveu o aumento na taxa de multiplicação dos explantes, sendo que para concentrações maiores não foram observados acréscimos de taxa (6). Para outras frutíferas, como as da família *Prunaceae*, tais como a ameixeira 'Santa Rosa' e o pessegueiro, houve correlação negativa entre o aumento da concentração de BAP e o alongamento dos brotos (7).

Tabela 3. Resumo da análise de variância em arranjo fatorial para os dados de massa fresca, obtido para as nove diferentes associações de concentrações de BAP e KIN no ensaio 2.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	P > F ¹
BAP	2	200,90	100,45	5,90	0,0058
KIN	2	16,75	8,38	0,49	0,6150
BAP*KIN	4	90,29	22,58	1,33	0,2773
BAP/KIN 0,0 mg L ⁻¹	2	164,56	82,28	4,84	0,0128
BAP/KIN 0,1 mg L ⁻¹	2	105,56	52,78	3,10	0,0547
BAP/KIN 0,2 mg L ⁻¹	2	21,06	10,53	0,62	0,5404
Resíduo	39	663,66	17,02		
Total	47	971,60			

Coeficiente de variação (%) = 34,56

¹ Probabilidade mínima de significância. ² Valores transformados para $(x)^{0.5}$. / = desdobrado dentro.

O teste de médias LSD aplicado para a fonte de variação BAP/KIN 0,0 mg L⁻¹ e

BAP/KIN 0,1 mg L⁻¹, que se mostraram significativas, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação de médias pelo teste LSD, a 5% de probabilidade, para o percentual de ganho de massa fresca, em 14 dias de cultivo *in vitro*, nas nove diferentes associações de concentrações de BAP e KIN¹.

Associações de concentrações (Meios de cultura)	KIN 0,0 mg L ⁻¹	KIN 0,1 mg L ⁻¹	KIN 0,2 mg L ⁻¹
BAP 0,0 mg L ⁻¹	66,91 b ²	103,90 b	109,11 ^{ns}
BAP 0,1 mg L ⁻¹	268,81 a	157,70 ab	176,23 ^{ns}
BAP 0,2 mg L ⁻¹	199,45 a	264,33 a	133,33 ^{ns}

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste LSD. ² Médias originais sem transformação de dados e análise estatística (letras) com base nos dados transformados para $(x)^{0.5}$. ^{ns} Não significativo.

Esses resultados indicam que o meio suplementado com BAP, seja com 0,1 ou 0,2 mg L⁻¹, propicia melhor desenvolvimento de brotações do que o meio sem adição de fitohormônios (0,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,0 mg L⁻¹ de KIN). Considerando o meio com concentração de KIN de 0,1 mg L⁻¹, o BAP em concentração de 0,2 mg L⁻¹ apresentou maior ganho de massa fresca quando comparado com a não-adição do BAP.

CONCLUSÕES

Os meios 5 (0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de KIN) e 6 (0,2 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de KIN) foram os mais adequados para a cultura de meristemas apicais de cana-de-açúcar da variedade RB857515.

Para o ganho de massa fresca em brotações da variedade RB855156, a adição de BAP, seja de 0,1 ou 0,2 mg L⁻¹, no meio de cultura possibilitou maiores índices de ganho de massa fresca quando comparados ao meio sem adição de BAP.

REFERÊNCIAS

- (1) GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa, 1990. p. 99-169.
- (2) LEE, T. S. G. Micropropagação de cana-de-açúcar através de cultura de meristema apical. **Saccharum APC**, 1984, v. 7, p. 36-39.
- (3) GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984.
- (4) MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, 1962, v. 15, p. 473-497.
- (5) SAS INSTITUTE. **SAS software: user's guide: version 8.2**. Cary: SAS Institute, 2000.
- (6) 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.

(7) 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.



Recebido: 10/07/2009

Aceito: 15/12/2009