



## ASSEPSIA DE PROPÁGULOS VEGETATIVOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA CULTIVO *In vitro*

**KÖPP, Maurício Marini<sup>1</sup>; PASSOS, Leônidas Paixão<sup>1</sup>; SOUZA SOBRINHO, Fausto<sup>1</sup>; VALE, Naine Martins<sup>2</sup>; BARILI, Leiri Daiane<sup>2</sup>; KELMER, Gislayne A. Rodrigues<sup>3</sup>; FILGUEIRAS, Aline Luciano<sup>3</sup>; MARQUES, Rafael<sup>3</sup>; FERNANDES, Fábio de Souza<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup> Embrapa Gado de Leite – Rua Eugenio do Nascimento, 610, CEP 36038-330, Juiz de Fora, MG. [kopp@cnppl.embrap.br](mailto:kopp@cnppl.embrap.br); <sup>2</sup> Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC; <sup>3</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

### 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, (*Saccharum officinarum*), é muito cultivada em países tropicais e subtropicais para obtenção do açúcar, do álcool e da aguardente, além da crescente utilização como recurso forrageiro sendo utilizada na alimentação animal como fonte de energia (Nussio et al., 2007). A baixa eficiência dos métodos de produção de mudas de cana-de-açúcar torna sua propagação inicial lenta e seu custo elevado, inviabilizando a utilização de variedades melhoradas pelos produtores de menor poder aquisitivo.

A micro-propagação vem sendo utilizada para reduzir o tempo na produção de mudas de boa qualidade e livres de doenças (Montarroyos, 2000). Dentre as etapas da micro-propagação a desinfestação têm apresentado baixa eficiência, pois deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal sem danificar e inviabilizar o mesmo.

Alguns dos agentes utilizados para a desinfestação de explantes são: cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio e, os mais comumente utilizados como, hipoclorito de cálcio e de sódio (Grattapaglia & Machado, 1998), onde suas concentrações variam de acordo o tipo do explante.

Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de desinfestação de três agentes desinfestantes para explantes de cana-de-açúcar, a fim de elaborar um protocolo de desinfestação para a introdução de cana-de-açúcar em cultivo *in vitro*.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal pertencente à Embrapa Gado de Leite, na cidade de Juiz de Fora, MG.

Foram utilizados explantes (meristemas axilares) de plantas jovens de quatro genótipos de cana-de-açúcar (1-Santa Isabel, 2-São José, 3-IAC 862480 e 4-IAC 862210), coletados em casa de vegetação. Na desinfestação os explantes foram imersos em álcool 70% (v/v) por cinco minutos, e posteriormente submetidos aos seguintes agentes de desinfestação segundo Sousa et al. (2007): hipoclorito de sódio (Cl) 1% por um período de 30 minutos, cloreto de benzalcônio (Bz) 0,1% e cloreto de mercúrio (Hg) 1% por 20 minutos, seguida de três lavagens em água destilada estéril. Para a indução de brotações foi utilizado o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), contendo 0,6% de ágar, 3% de sacarose e suplementado com 2  $\mu$ mol 6-benzilaminopurina (BAP) e 1  $\mu$ mol ácido naftalenoacético (ANA) em delineamento inteiramente casualizado com três repetições mantidas em câmara com controle ambiental (240 mol/s.m<sup>2</sup> de irradiância, 30  $\pm$  4°C, 86  $\pm$  4% de U.R. e 14 horas de fotoperíodo).

O experimento foi avaliado 15 dias após a introdução, as variáveis observadas foram: *i*) número de explantes contaminados; *ii*) número de sobrevivência de explantes e *iii*) número de explantes oxidados. Os resultados foram submetidos a análise de variância considerando agentes de desinfestação e genótipo como fatores fixos. Os efeitos da interação entre estes fatores foram testados através de teste de comparação de médias (Tukey  $p \leq 5\%$ ) entre agentes nos diferentes níveis do fator genótipo, sendo apresentados na forma de gráficos e a respectiva significância das comparações de médias.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

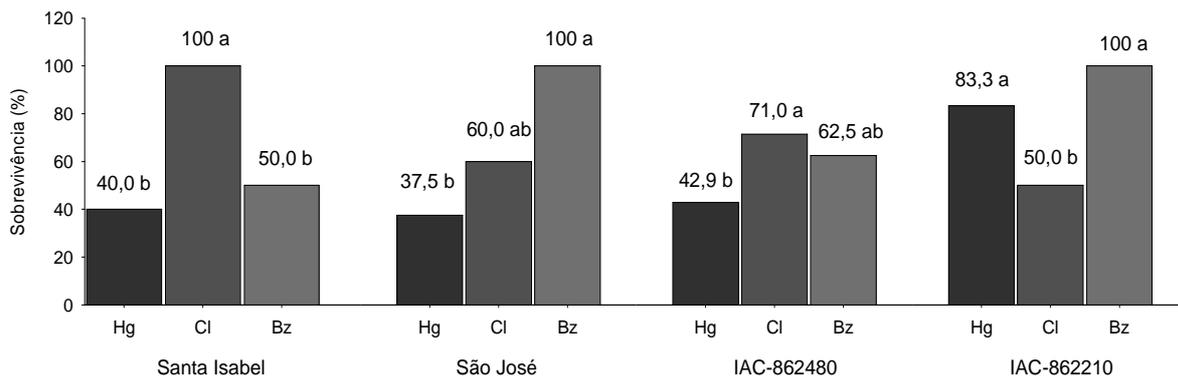
Pode ser observado na Figura 1 que os genótipos apresentam respostas diferenciais em relação a tolerância a cada agente desinfestante, corroborando os resultados de Sousa et al. (2007) que determinaram diferentes agentes para desinfestação de acessos de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*.

De acordo com os resultados apresentados, para os genótipos São José e IAC-862210, o tratamento que possibilitou a melhor porcentagem de sobrevivência dos meristemas introduzidos foi o cloreto de benzalcônio (Bz). Já para o genótipo Santa Isabel, o melhor tratamento foi com o agente hipoclorito de sódio (Cl) proporcionando maior pegamento das gemas. No caso do genótipo IAC-862480 pode ser visualizado que os agentes cloreto de benzalcônio e hipoclorito de sódio propiciaram bons índices de pegamento dos meristemas tratados com estes agentes. Por outro lado pode ser observado que o tratamento com cloreto de mercúrio (Hg), foi o de menor eficácia no que diz respeito a porcentagem de sobrevivência, com exceção do genótipo IAC-862210 que parece tolerar o tratamento com cloreto de mercúrio de maneira mais eficiente que outros genótipos.

Segundo Cathum et al. (2005) o mercúrio é um metal pesado considerado altamente tóxico tanto às plantas como aos animais podendo ser encontrado no solo, água e atmosfera. Por esse motivo o tratamento com mercúrio é ineficiente no que diz respeito a sobrevivência de gemas de cana-de-açúcar. De acordo com os resultados apresentados na Figura 1 fica evidente que o agente de desinfestação menos tóxico aos explantes de cana de açúcar, independente do genótipo é o cloreto de benzalcônio. No entanto, a eficiência do método de desinfestação deve levar em consideração além da toxidez do agente para o explante, também a

eficiência de combate aos microorganismos responsáveis pela contaminação do meio de cultivo.

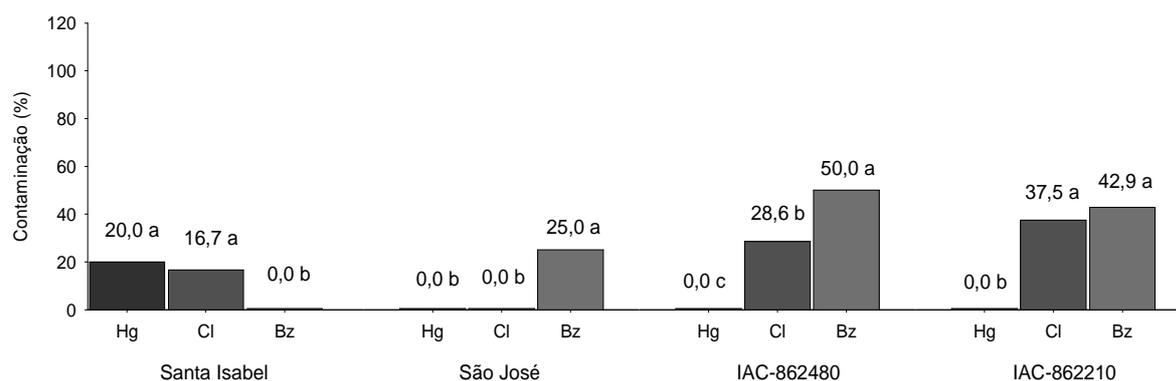
Os resultados apresentados na Figura 2 indicam que todos os agentes utilizados promoveram uma boa desinfestação dos explantes, com índices de contaminação máximos em torno de 50% para o agente cloreto de benzalcônio nos genótipos IAC. No entanto, assim como para sobrevivência dos explantes, percebe-se que os genótipos reagem diferencialmente em relação a descontaminação com cada agente desinfestante. Neste caso o genótipo Santa Isabel foi o único em que o cloreto de benzalcônio apresentou elevada eficiência no combate aos microorganismos contaminantes.



**Figura 1.** Teste de comparação de médias da porcentagem de sobrevivência em quatro genótipos de cana-de-açúcar submetidos a três agentes desinfestantes para cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra para cada genótipo não diferem estatisticamente entre si (Tukey  $p \leq 5\%$ ).

No entanto pode ser verificado na Figura 2, que o tratamento com cloreto de mercúrio foi o mais eficiente como agente desinfestante, não apresentando contaminação nos genótipos São José, IAC-862480 e IAC-862210, mostrando ser um bom agente desinfestante de cana-de-açúcar. Apesar do cloreto de mercúrio ter apresentado um baixo nível de sobrevivência, o seu bom desempenho como desinfestante justifica a sua utilização, principalmente em genótipos com tolerância a este agente como o caso do genótipo IAC-862210.

Ainda na Figura 2, verifica-se que o cloreto de benzalcônio foi o tratamento de menor eficiência no que diz respeito a desinfestação de explantes de cana-de-açúcar, visto que em todos os genótipos exceto o Santa Isabel a porcentagem de contaminação foi elevada. O cloreto de benzalcônio, apesar de pouco tóxico aos vegetais, sua eficiência na desinfestação parece ser menor em relação aos outros produtos. Por fim nota-se que o tratamento com hipoclorito de sódio apresentou uma eficiência intermediária entre o cloreto de mercúrio e o cloreto de benzalcônio no controle das infestações.



**Figura 2.** Teste de comparação de médias da porcentagem de contaminação em quatro genótipos de cana-de-açúcar submetidos a três agentes desinfestantes para cultivo *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra para cada genótipo não diferem estatisticamente entre si (Tukey  $p \leq 5\%$ ).

Os resultados da análise conjunta dos quatro genótipos vs agentes desinfestantes em relação ao número de tubos oxidados, mostram que, o agente cloreto de mercúrio de alguma forma minimizou a oxidação dos tubos, que é provocada por compostos resultantes do metabolismo do tecido vegetal (dados não apresentados). Em contrapartida o hipoclorito de sódio foi o que acarretou o maior porcentagem de oxidações. Deve ser ressaltado que a oxidação é um processo que não interfere no desenvolvimento do material vegetal e não contribui para o aparecimento de contaminações, no entanto dificulta a sua visualização caso esteja presente aumentando a probabilidade de propagação da contaminação durante as sucessivas geração de cultivo *in vitro*.

#### 4. CONCLUSÕES

A eficiência do agente desinfestante é dependente do genótipo de cana-de-açúcar que se pretende tratar.

O agente desinfestante cloreto de mercúrio, foi o que apresentou, para a maioria dos genótipos, a melhor eficiência na desinfestação de explantes de cana-de-açúcar, quando imersos por 30 minutos na concentração de 1%.

O melhor índice de sobrevivência encontrado para a maioria dos genótipos ocorreu quando desinfestados com cloreto de benzalcônio a 0,1% por 30 minutos.

Recomenda-se a utilização de cloreto de mercúrio 1% por 30 minutos para a desinfestação de explantes de cana-de-açúcar para cultivo *in vitro*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CATHUM, S.; VELICOGNA, D.; OBENAU, A.; DUMOUCHEL, A.; PUNT, M.; BROWN, C.E.; RIDAL, J. Detoxification of Mercury In The Environment. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, 2005, v.381, n.4, p.1491-1498.
- 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/CNPH, v.1, 1998. p.183-260.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, 2000, v.36/37, p.5-10.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 1962, v.15, n.3, p.473-497.

NUSSIO, L.G.; SANTOS, M.C.; QUEIROZ, O.C.M. Estratégias para produção de bovinos diante da expansão da cultura canavieira. In: NUSSIO, L.G. (Ed.) **Manejo de pastagem**. Piracicaba: FEALQ, 2007. p.243-272.

SOUSA, G.C.; CLEMENTE, P.L.; ISAAC, V.L.R.; FARIA, S.P.; CAMPOS, M.R.C. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispera*. **Revista Brasileira de Biociências**, 2007, v.5, n.1, p.405-407.