

Notas Científicas

Cultivo in vitro de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz

Felipe Aarão Maluta⁽¹⁾, Stevan Ricardo Bordignon⁽¹⁾, Monica Lanzoni Rossi⁽²⁾,
Gláucia Maria Bovi Ambrosano⁽³⁾ e Paulo Hercílio Viegas Rodrigues⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Ornamentais, Departamento de Produção Vegetal, Avenida Pádua Dias, nº 11, São Dimas, CEP 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: femaluta@hotmail.com, stevanbordignon@gmail.com, phrviegas@usp.br ⁽²⁾Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas, Avenida Centenário, nº 303. E-mail: monicalr@cena.usp.br ⁽³⁾Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Departamento de Bioestatística. E-mail: glaucia@fop.unicamp.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes comprimentos de onda no desenvolvimento in vitro de mudas de cana-de-açúcar. Explantes foram submetidos a quatro tratamentos de diodos emissores de luz (LED): 100% azul; 70% azul + 30% vermelha; 30% azul + 70% vermelha; 100% vermelha, além do controle com lâmpada fluorescente branca. As plântulas foram avaliadas quanto a: número de brotações; altura; massa de matéria fresca e seca; e conteúdo de carotenoides e das clorofilas a e b. Observou-se desmanche dos tilacoides nos cloroplastos, proporcional ao aumento na incidência de luz vermelha. O porte das mudas diminuiu com o aumento na incidência de luz vermelha.

Termos para indexação: *Saccharum officinarum*, biorreator de imersão temporária, cloroplastos, micropropagação, LED.

In vitro culture of sugarcane exposed to different light sources

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effect of different wave length on the in vitro development of sugarcane seedlings. Explants were subjected to four light emitting diodes (LED): 100% blue; 70% blue + 30% red; 30% blue + 70% red; 100% red, besides the control with white fluorescent lamp. Seedlings were evaluated for: number of shoots; height; fresh and dry matter mass; and contents of carotenoids and chlorophyll a and b. It was observed thylakoid disarrangement in the chloroplast, proportional to the increasing incidence of red light. The size of the in vitro produced seedlings reduces with the increase of red light incidence.

Index terms: *Saccharum officinarum*, temporary immersion bioreactor, chloroplasts, micropropagation, LED.

A baixa disponibilidade de mudas sadias e certificadas é uma das dificuldades enfrentadas pelo setor sucroalcooleiro, que tem crescimento médio anual de aproximadamente 3 a 5% (Veiga, 2006). O uso de biorreatores de imersão temporária (BIT), sobretudo na fase de alongamento e enraizamento de cana-de-açúcar, permite a obtenção de mudas de alta qualidade sanitária, em meio de cultura líquido, e apresenta inúmeras vantagens em comparação ao processo convencional (Teixeira, 2006). Apesar de vantajoso, o BIT comporta densidade limitada de plantas, pois a introdução de um grande número de explantes aumenta a competição por luz no centro do biorreator e favorece a formação de plantas aclorofiladas (Barros et al., 2011). Essa competição

poderia ser atenuada com o suprimento adicional de luz no interior do BIT. Os diodos emissores de luz (LED) são adequados para essa função, em razão de sua versatilidade e facilidade de combinações de fontes de luz.

A utilização dos LED na propagação in vitro foi avaliada nos cultivos de orquídea *Cymbidium* (Huan & Tanaka, 2004), morango (*Fragaria vesca* L.) (Rocha et al., 2010) e crisântemo (*Chrysanthemum*) (Kim et al., 2004), com resultados expressivos na qualidade da muda produzida e maior eficiência no processo produtivo. Na avaliação de diferentes combinações de LED vermelho e azul, no cultivo in vitro de morango, Nhut et al. (2003) relataram o alto custo do LED azul, que inviabilizaria o uso dessa fonte no cultivo

comercial de mudas in vitro. Alterações do número de estômatos nas folhas de crisântemo foram observadas com diferentes combinações de LED, o que levou à conclusão de que o ajuste e a escolha da fonte desse tipo de luz são importantes para o sistema de iluminação artificial, no cultivo in vitro (Kim et al., 2004).

Pouco se sabe sobre o comportamento da cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes luminosas. Portanto, é importante que se avaliem os efeitos de possíveis combinações de LED no porte das mudas, no número de brotações e em possíveis alterações morfológicas. A redução do porte das mudas no sistema BIT aumenta a produtividade do sistema e pode ser alcançado com a adequação da fonte luminosa.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes comprimentos de onda no desenvolvimento in vitro de mudas de cana-de-açúcar.

O ensaio foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Ornamentais (LCTPO) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, com mudas in vitro de cana-de-açúcar, da cultivar CTC-07, fornecidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

As mudas foram avaliadas em sistema de iluminação de LED nas cores vermelha LPEL-06R3-B (620–630 nm) e azul LPEL-06B3-B (455–475 nm). Foram avaliadas quatro combinações de LED, nas cores: T1, 100% vermelha; T2, 100% azul; T3, 70% azul + 30% vermelha; e T4, 70% vermelha + 30% azul. No controle (TC), foi utilizado-se lâmpada fluorescente branca, com intensidade luminosa ajustada para $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Foram utilizados 40 explantes por tratamento, em oito vidros de 200 mL (cinco explantes por vidro) com 40 mL de meio de cultivo líquido MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de benzilaminopurina (BAP). Os explantes foram propagados por cinco subcultivos.

A avaliação dos explantes ocorreu semanalmente e o meio de cultivo foi trocado a cada duas semanas, até completar o quinto subcultivo, quando as brotações foram medidas, quantificadas e individualizadas. Os dados foram expressos pela média do número de brotações por vidro e do comprimento (cm) dos explantes. Ao final do quarto subcultivo, coletaram-se amostras de todas as folhas das brotações obtidas, independentemente da posição, expostas a diferentes fontes de luz (100 mg de tecido foliar), a fim de quantificar os teores de carotenoides e de clorofilas

a e b, em extrato acetônico (80%). A quantificação dos pigmentos foi realizada por espectrofotometria (clorofila a = 663 nm, clorofila b = 645 nm, e carotenoides = 470 nm), conforme Lichtenthaler (1987).

Após a coleta dos dados, os explantes foram lavados em água corrente, secos em papel toalha e imediatamente pesados para cálculo da massa de matéria fresca, em cinco vidros de cada tratamento, selecionados ao acaso. Em seguida, foram armazenados em sacos de papel e secos em estufa a 65°C , por 48 horas, e pesados para o cálculo da massa de matéria seca.

Amostras de tecidos foliares das plântulas in vitro foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão, de acordo com Gratão et al. (2009). O material foi examinado a 50 kV, com auxílio de um microscópio eletrônico de transmissão EM-900 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha), e as imagens foram digitalizadas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade, quanto a: número final de brotações por vidro; massa de matéria fresca; massa de matéria seca; e comprimento do explante – da ponta da maior folha ao final do colmo. Os resultados relativos às clorofilas a e b e carotenoides foram submetidos ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O número médio de brotações foi maior no controle, que diferiu significativamente dos tratamentos T1 e T2 (Tabela 1). Huan & Tanaka (2004) avaliaram uma combinação com 75% azul e 25% vermelho – semelhante ao tratamento T3 – e observaram maior número de brotações, em *Cymbidium*, do que no tratamento à luz fluorescente branca. Rocha et al. (2010) verificaram, em morangueiro, maior número de brotações sob LED azuis, vermelhos e verdes do que sob lâmpadas fluorescentes brancas e Growlux, independentemente da concentração de BAP avaliada.

Os tilacoides encontram-se agregados em bandas de 3 a 3 e até de 5 a 5, separados por um espaço interbanda, e distribuídos paralelamente ao eixo maior do cloroplasto (Figura 1). Os tratamentos com LED vermelho resultaram no desmanche dos tilacoides dessas bandas, o que os deixou soltos e de forma enovelada dentro do cloroplasto. A alteração máxima foi observada no tratamento com 100% vermelho (Figura 1 D). A luz vermelha é importante para o

Tabela 1. Número de brotações, comprimento, massa de matéria fresca, massa de matéria seca e conteúdos de carotenoides e de clorofila a e clorofila b, das brotações de mudas de cana-de-açúcar produzidas in vitro, após cinco subcultivos em diferentes tratamentos de luz⁽¹⁾.

Tratamento de luz	Brotações	Comprimento (cm)	Massa de	Massa de	Carotenoides	Clorofila a	Clorofila b
			matéria fresca	matéria seca			
			------(g)-----		------(mg g ⁻¹)-----		
100% vermelha	20,60bc	3,21c	16,32ab	0,80ab	0,92ab	1,57bc	0,53b
100% azul	19,05c	3,88b	12,95bc	0,64bc	1,14a	1,99a	0,67ab
70% azul + 30% vermelha	19,47bc	4,00b	10,11c	0,61c	0,59b	1,53c	0,47b
70% vermelha + 30% azul	23,79ab	3,18c	16,73a	0,93a	0,95ab	1,73abc	0,51b
Controle (fluorescente branca)	25,37a	4,45a	16,94ab	0,86a	1,14ab	1,94ab	0,82a
CV (%)	29,73	52,98	19,48	16,03	21,70	8,22	16,89

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade, para número de brotações, comprimento e massa de matéria fresca e seca. Para os conteúdos de carotenoides e de clorofilas, as médias não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

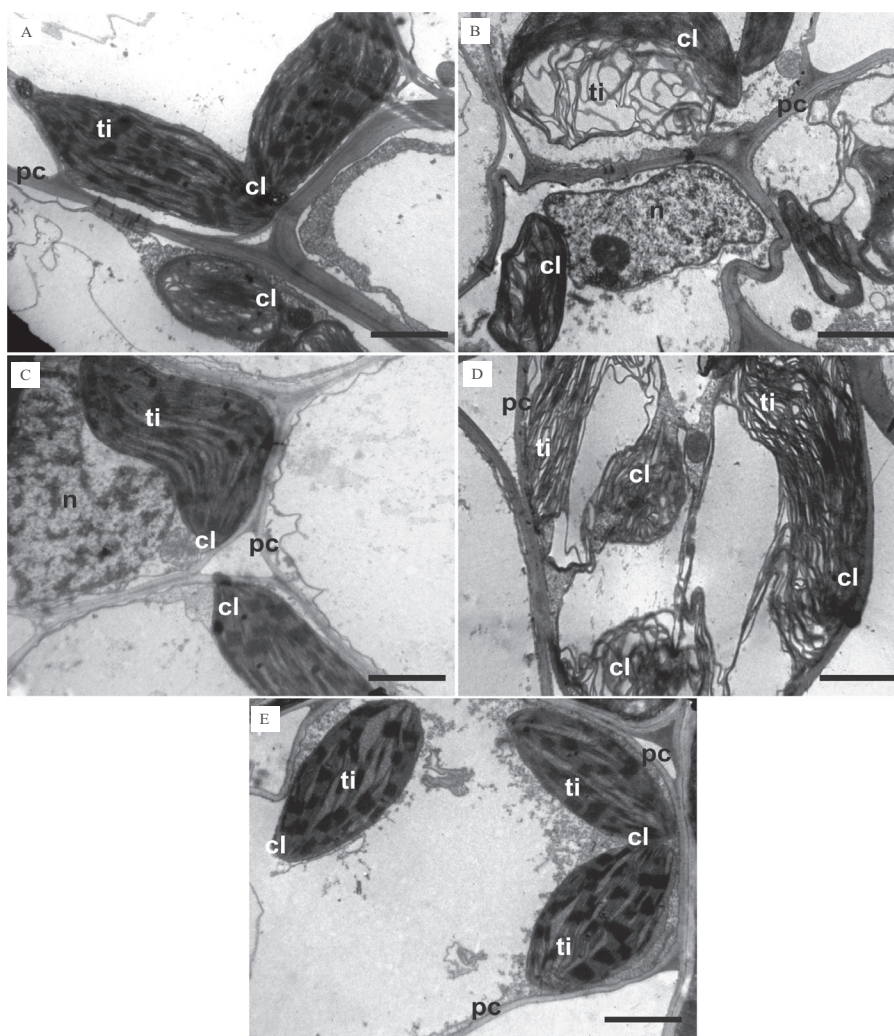


Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão, da região das células do mesofilo foliar de cana-de-açúcar, cultivadas in vitro, após cinco subcultivos em diferentes tratamentos de fontes de luz: A, 70% azul + 30% vermelha; B, 70% vermelha + 30% azul; C, 100% azul; D, 100% vermelha; E, luz fluorescente branca (controle). cl, cloroplasto; ti, tilacoides; n, núcleo; pc, parede celular. Barras: 2 μ m.

desenvolvimento da estrutura fotossintética, pois esta emite um espectro próximo da absorvância máxima das clorofilas e fitocromos (Saebø et al., 1995).

Dekker & Boekema (2005) e Kiss et al. (2009) relataram que esse desmanche se dá em razão de um mecanismo de compensação pela qualidade de luz incidente, e ocorre quando a intensidade de luz excede a capacidade fotossintética da planta. No entanto, ainda não se sabe ao certo o impacto destes desmanches sobre um sistema de produção agrícola. Os tratamentos com LED vermelho apresentaram menores quantidades de clorofilas a e b (Tabela 1). Provavelmente o desmanche dos tilacoides nos cloroplastos foi o responsável por esse resultado.

Os tratamentos com LED azuis apresentaram menor emissão de brotações, mesmo sem alterações nos cloroplastos (Tabela 1). Esse resultado difere do observado em *Cymbidium* e morango (Huan & Tanaka, 2004; Rocha et al., 2010).

O comprimento das brotações e a massa de matéria fresca também foram influenciados pelas diferentes fontes de luz (Tabela 1). A maior média de comprimento foi observada com luz fluorescente branca (controle), o que é indesejável no cultivo de cana-de-açúcar em BIT. Barros et al. (2011) também constataram que a luz fluorescente aumenta o comprimento das brotações. Os menores comprimentos foram encontrados com maior incidência de luz vermelha. Esses resultados indicam que a competição dos explantes pela luz foi maior com a lâmpada fluorescente branca, que produziu as maiores plantas, com exemplares que chegaram a 12,5 cm. Nos tratamentos com luz vermelha, houve exemplares com no máximo 7,5 cm de comprimento. Assim, a propagação in vitro em BIT pode se beneficiar com maior percentagem de luz incidente vermelha (620–630 nm), uma vez que a menor competição entre explantes menores aumentaria a produtividade do BIT, que comportaria um maior número de exemplares.

O controle e o tratamento com 100% vermelho apresentaram maior massa de matéria fresca do que os tratamentos com LED azuis. As alterações causadas pela luz vermelha nos tilacoides e nos teores de clorofilas a e b não foram suficientes para prejudicar a produção de matéria fresca e provavelmente não alteraram o vigor das mudas.

O uso de LED vermelho reduz o porte das mudas, o que implica maior produtividade no sistema in vitro.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), por concessão de bolsa; à Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo apoio financeiro; ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (Nap/Mepa, Esalq/USP), na pessoa do Dr. Elliot Watanabe Kitajima, pela permissão de uso do microscópio eletrônico de transmissão.

Referências

- BARROS, A.C.B.; COSTA, D.A.; MEDEIROS, E.C. Biorreator de imersão temporária aplicado na biofábrica de cana-de-açúcar. In: GERALD, L.T.S. (Ed.). **Biofábrica de plantas**: produção industrial de plantas in vitro. São Paulo: Antiqua, 2011. p.52-71.
- DEKKER, J.P.; BOEKEMA, E.J. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, v.1706, p.12-39, 2005. DOI: 10.1016/j.bbabi.2004.09.009.
- GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; PERES, L.E.P.; MEDICI, L.O.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.387-394, 2009. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2009.06.017.
- HUAN, L.V.T.; TANAKA, M. Effects of red and blue light-emitting diodes on callus induction, callus proliferation, and protocorm-like body formation from callus in *Cymbidium* orchid. **Environment Control in Biology**, v.42, p.57-64, 2004. DOI: 10.2525/ecb1963.42.57.
- KIM, S.J.; HAHN, E.J.; HEO, J.W.; PEAK, K.Y. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro. **Scientia Horticulturae**, v.101, p.143-151, 2004. DOI: 10.1016/j.scienta.2003.10.003.
- KISS, A.Z.; RUBAN, A.V.; HORTON, P. The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, p.3972-3978, 2009. DOI: 10.1074/jbc.M707410200.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.350-382, 1987. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- NHUT, D.T.; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; OKAMOTO, K.; TANAKA, M. Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.73, p.43-52, 2003. DOI: 10.1023/A:1022638508007.
- ROCHA, P.S.G. da; OLIVEIRA, R.P. de; SCIVITTARO, W.B.; SANTOS, U.L. dos. Diodos emissores de luz e

concentrações de BAP na multiplicação in vitro de morangueiro. **Ciência Rural**, v.40, p.1922-1928, 2010. DOI: 10.1590/S0103-84782010000900011.

SAEBØ, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.41, p.177-185, 1995. DOI: 10.1007/BF00051588.

TEIXEIRA, J.B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 27p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 180).

VEIGA, C.F.M. de. **Diagnóstico da cadeia produtiva da cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Faerj: Sebrae, 2006. 107p.

Recebido em 31 de outubro de 2012 e aprovado em 30 de agosto de 2013