

# Brotação de cana-de-açúcar em meio de cultura a base de M.S. enriquecido com KIN (Cinetina) e BAP (6-benzilaminopurina)

*Sproutin of sugarcane in culture medium based on M.S. enriched with KIN (Kinetin) and BAP (6-benzylaminopurine)*

MARIA EDUARDA SOUSA CAIXETA  
Discente do curso de Agronomia (UNIPAM)  
E-mail: mariasousa1@unipam.edu.br

WALTER VIEIRA DA CUNHA  
Professor orientador (UNIPAM)  
E-mail: walter@unipam.edu.br

---

**Resumo:** A cana-de-açúcar é uma cultura muito importante no agronegócio brasileiro, por isso, a utilização de cultivares com boas características econômicas e industriais torna-se necessária. Dessa forma, a micropropagação ganha destaque nesse mercado, visto que as mudas são de excelente qualidade fitossanitária, além de utilizarem espaço e tempo reduzidos. Portanto, objetivou-se desenvolver um protocolo para propagação *in-vitro* de mudas de cana-de-açúcar. O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Biotecnologia, do Unipam, sendo primeiramente plantados mini toletes de cana-de-açúcar. Quando brotados foram retirados palmitos de 5 cm e feita a desinfestação superficial, para em seguida retirar os meristemas em solução (PVP) 3%. Estes, foram colocados em frascos com meio MS, sendo o primeiro tratamento somente com meio MS e o segundo acrescido de citocininas, cinetina e 6-benzilaminopurina. Foram mantidos em sala de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 16 horas e após 21 dias avaliou-se a presença de brotação, oxidação e contaminação dos meristemas. O meio de cultura suplementado com as citocininas, aumentou a porcentagem de brotação dos meristemas, e não houve diferença estatística entre os meios de cultura com e sem adição de hormônios em relação a oxidação e a contaminação.

**Palavras-chaves:** citocininas; hormônios; micropropagação.

**Abstract:** Sugarcane is a very important crop in Brazilian agribusiness, therefore, the use of cultivars with good economic and industrial characteristics becomes necessary. In this way, micropropagation gains prominence in this market, as the seedlings have excellent phytosanitary quality, in addition to using reduced space and time. Therefore, the objective was to develop a protocol for *in-vitro* propagation of sugarcane seedlings. The work was carried out at Unipam's Genetics and Biotechnology Laboratory, with mini sugarcane billets being planted first. When they sprouted, 5 cm palm hearts were removed and surface disinfestation was carried out, and then the meristems were removed in a 3% solution (PVP). These were placed in flasks with MS medium, the first treatment being only with MS medium and the second with cytokinins, kinetin and 6-benzylaminopurine added. They were kept in a growth room at 25°C with a 16-hour photoperiod and after 21 days the presence of sprouting, oxidation and contamination of the

meristems was evaluated. The culture medium supplemented with cytokinins increased the percentage of meristem sprouting, and there was no statistical difference between the culture media with and without the addition of hormones in relation to oxidation and contamination.

**Keywords:** cytokinins; hormones; micropropagation.

---

## 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) ascende como uma das culturas mais proeminentes no cenário do agronegócio brasileiro, com o país destacando-se como o principal produtor global. Conforme dados divulgados pela Conab (2023), o Brasil alcançou um volume total de aproximadamente 600 milhões de toneladas na safra 2022/23, registrando um aumento de 5,4% em relação à safra anterior. Nesse contexto, a região sudeste desponta como a principal produtora da cultura, com ênfase nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Esse crescimento é atribuído à relevância da cultura, que se destaca como a principal fonte para a produção de açúcar e outros subprodutos, como o etanol (Franca, 2016).

Para garantir o êxito da cultura, é imprescindível a utilização de cultivares que apresentem características econômicas e industriais favoráveis. Nesse sentido, o melhoramento genético emerge como um fator determinante para superar desafios como pragas, doenças e aprimoramento industrial e econômico (Rosse; Vencovsky; Ferreira, 2002). Entretanto, a lenta taxa de multiplicação prolonga o ciclo de desenvolvimento, exigindo de 10 a 15 anos para a introdução de uma nova cultivar no mercado (Ali; Naz; Iqbal, 2008).

Para atender à crescente demanda do setor, é essencial otimizar a produção de mudas de cana-de-açúcar. Nesse contexto, a micropropagação emerge como uma técnica de destaque no processo de propagação vegetativa por colmos, pois permite a obtenção de mudas de melhor qualidade com taxas de multiplicação elevadas em um tempo e espaço reduzidos (Etienne; Berthouly, 2002). Para tanto, utiliza-se a técnica de regeneração do explante *in vitro* por meio da cultura de meristemas, capaz de replicar geneticamente características idênticas à planta mãe. Além disso, essa abordagem apresenta baixos índices de perdas devido à contaminação, elimina patógenos como vírus e bactérias, e oferece economia de tempo em comparação com outras técnicas convencionais (Biasi; Passos; Pomer, 1998; Gomide, 2004; Dutra *et al.*, 2011).

A técnica de propagação da cana-de-açúcar por meio de meristema apical é reconhecida como uma alternativa vantajosa para a multiplicação de diversas variedades, devido à obtenção de mudas de excelente qualidade fitossanitária e idênticas ao material de origem. No caso da cana-de-açúcar, o meristema apical é o explante inicial a ser micropropagado, o qual, após ser isolado e inoculado em meio de cultura, desenvolve-se para originar as plântulas que serão multiplicadas, enraizadas e aclimatizadas (Lee, 1987; Sarwar; Siddiqui, 2004; Silva *et al.*, 2009). Nesse contexto, o meio de cultura desempenha um papel crucial, fornecendo suporte ao explante e os nutrientes essenciais para sua sobrevivência. Dentre os componentes do meio de cultura encontram-se os macronutrientes e micronutrientes, reguladores de crescimento, vitaminas e fontes de carboidratos (Carvalho *et al.*, 2006).

Portanto, o crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pelo equilíbrio e interação dos fitormônios presentes no meio de cultura, com destaque para citocininas e auxinas. Assim, o refinamento e desenvolvimento de protocolos *in vitro* relativos aos fitormônios podem resultar em níveis aprimorados de desenvolvimento dos explantes a serem cultivados (Silva *et al.*, 2009). Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência das citocininas, cinetina e 6-benzilaminopurina, na brotação, oxidação e contaminação de meristemas de mudas de cana-de-açúcar propagadas *in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO, ORIGEM DO MATERIAL E ASSEPSIA

O estudo foi conduzido no Laboratório de Genética e Biotecnologia - GENE, situado no Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, localizado em Patos de Minas, Minas Gerais.

Inicialmente, mini toletes de cana-de-açúcar foram plantados em sacos plásticos para mudas de 15 cm x 25 cm, contendo substrato Carolina®. Os minis toletes foram posicionados com as gemas voltadas para cima, a uma profundidade de 2 cm, e mantidos em casa de vegetação. Após o brotamento e atingirem um comprimento médio de 20 cm, os palmitos foram retirados, com cerca de 5 cm de altura.

Posteriormente, os palmitos foram então submetidos a um processo de desinfecção em uma câmara de fluxo laminar, primeiro com álcool 70% por 1 minuto, seguido por hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, e, em seguida, enxaguados três vezes com água destilada esterilizada. Após a desinfecção, os palmitos foram individualmente colocados em placas de Petri contendo Polivinilpirrolidona (PVP) 3% autoclavada. Com o auxílio de um bisturi, as folhas externas dos palmitos foram removidas e o meristema foi isolado, seguindo a metodologia descrita por Alcantara *et al.* (2014) com modificações.

### 2.2 MEIO DE CULTURA

Para avaliar as brotações dos meristemas, foram estabelecidos dois tratamentos utilizando o meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) semissólido, enriquecido com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e 0,1 g L<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina. O primeiro tratamento consistiu apenas no meio de cultura MS, enquanto no segundo tratamento foram adicionadas as citocininas: 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (KIN) e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP). O pH dos dois tratamentos foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Cada frasco de cultura continha 60 mL de meio em um volume total de 250 mL.

O material foi mantido em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, no escuro, por sete dias para indução de brotações, seguido por um fotoperíodo de 16 horas nas fases subsequentes. Após 21 dias, a presença de brotações, contaminação e oxidação em cada meristema foi avaliada, conforme descrito por Franca (2016) com modificações.

### 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental do trabalho foi realizado de forma inteiramente casualizada, com 12 repetições por tratamento e um meristema por repetição. Os resultados foram avaliados por meio do teste t, com um nível de significância de 5%.

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram uma maior taxa de brotação dos meristemas no meio de cultura MS suplementado com cinetina e 6-benzilaminopurina. No tratamento com adição de hormônios, a taxa de brotação foi de 58,3%, enquanto que para o meio de cultura MS sem adição de citocininas foi inferior a 20%. Entretanto, em relação à oxidação e à contaminação, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os meios de cultura com e sem a adição de hormônios. O teste t, com um nível de significância de 5%, indicou diferença estatística apenas para a porcentagem de brotação (ver Tabela 1).

**Tabela 1** — Porcentagem de brotação, oxidação e contaminação na presença e ausência de hormônio, cinetina e 6-benzilaminopurina, em cana-de-açúcar. Patos de Minas – MG, 2024.

Parâmetros	Sem Hormônio	Com Hormônio
Brotção	16,7 a	58,3 b
Sem oxidação	58,3 ns	66,7 ns
Sem contaminação	66,7 ns	91,7 ns

\*Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste t ao nível de 5%. ns.: não significativo.

Fonte: dados da pesquisa, 2022.

O equilíbrio entre os hormônios adicionados ao meio de cultura MS desempenha um papel crucial na regulação do crescimento e da morfogênese dos tecidos *in vitro*, sinalizando o alongamento e a multiplicação da parte aérea da planta (Aires *et al.*, 2008). O objetivo primordial desses reguladores vegetais é corrigir deficiências de fitormônios que podem surgir nos explantes (Grattapaglia; Machado, 1998). Nesse contexto, fica claro que a adição de citocininas ao meio de cultura MS favorece a brotação de meristemas de cana-de-açúcar, corroborando os resultados obtidos neste estudo. Esses achados estão em consonância com a pesquisa de Franca (2016), que observou um aumento na porcentagem de brotação de meristemas de cana-de-açúcar em meio de cultura MS suplementado com 6-benzilaminopurina e cinetina.

Em relação à oxidação, esta ocorre devido à liberação de compostos fenólicos pelos meristemas no meio de cultura. No entanto, quando em excesso, esses compostos podem gerar substâncias tóxicas que inibem o crescimento dos explantes e causam escurecimento do material vegetal. Essas substâncias são metabolizadas pelas enzimas polifenoloxidasas, alterando a composição do meio de cultura e a absorção de metabólitos (Andrade *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001; Lima, 2010).

Tendência semelhante foi observada por Bezerra *et al.* (2014), confirmando a existência da relação entre a porcentagem de oxidação e a quantidade de citocinina utilizada no meio de cultura, evidenciando que quanto menor a quantidade de citocinina, maior será os valores de oxidação, corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa. De certa forma, esse resultado pode estar relacionado com o uso de antioxidantes, como polivinilpirrolidona (PVP), na extração e manipulação dos meristemas (Souza, 2015).

No que refere a contaminação no meio de cultura, são causadas por bactérias e fungos, sendo a contaminação por bactérias a mais recorrente e mais drástica (Pereira; Corrêa; Boliani, 2011). O uso de antibióticos é uma alternativa para prevenir e diminuir a contaminação bacteriana, sendo a estreptomicina muito utilizada. Esse antibiótico é o que apresenta menor toxicidade do grupo dos aminoglicosídeos, possuindo efeito proveniente da sua concentração no meio de cultura (Pollock; Barfield; Shields, 1983).

É possível afirmar que no presente estudo não foi observada uma relação entre a contaminação dos meios de cultura e a presença ou ausência de reguladores vegetais nos mesmos. Estes resultados contrastam com os de Costa *et al.* (2007) e Rosa (2009), que relataram um aumento na taxa de contaminação com o aumento da concentração de reguladores vegetais nos explantes. Além disso, Rosa (2009) sugere que as citocininas, em certas concentrações, podem contribuir significativamente para a multiplicação de microrganismos. De acordo com Teixeira (2001), na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro*, a contaminação é um dos principais desafios enfrentados.

#### 4 CONCLUSÃO

A adição das citocininas cinetina e 6-benzilaminopurina ao meio de cultura MS resulta em um aumento na porcentagem de meristemas brotados. No entanto, em relação à oxidação e à contaminação, esses hormônios não demonstraram influência significativa.

#### REFERÊNCIAS

- AIRES, P. S. R. *et al.* Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina na micropropagação *in vitro* da mamona utilizando o genótipo BRS nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. V. 8, n. 2, p. 80-83, 2008.
- ALCANTRA, G. B. *et al.* Multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações *in vitro* de clones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 20-25, 4 fev. 2014. Universidade Federal do Tocantins.
- ALI, A.; NAZ, S.; IQBAL, J. An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, n.1, p. 139-149, 2008.

BROTAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM MEIO DE CULTURA A BASE DE M.S.  
ENRIQUECIDO COM KIN (CINETINA) E BAP (6-BENZILAMINOPURINA)

ANDRADE, M. W. *et al.* Micropropagação da aroeira (*myracrodruon urundeuva* Fr. An.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

BEZERRA, R. M. de F. *et al.* Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 771-778, jan. 2014.

BIASI, L. A.; PASSOS, I. R. DA S.; POMMER, C. V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 55, n. 2, mai./ago. 1998.

CARVALHO, M. F. C. C. *et al.* Fatores inerentes à micropropagação. **EMBRAPA Algodão**. Campina Grande, 2006.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-Açúcar**. V.8 – Safra 2022/23, N.4 - Quarto levantamento, Brasília, abr. 2023.

COSTA, A. S. *et al.* Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 68-72, 2007.

DUTRA, L. F. *et al.* **Protocolo de micropropagação em cana-de-açúcar**. Circular Técnica. Pelotas: Embrapa, 2011.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary Immersion Systems in Plant Micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Kluwer Academic Publishers. p. 215-231, 2002.

FRANCA, M. A. **Micropropagação de cana-de-açúcar cultivar RB966928**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

GOMIDE, D. G. **Influência do número de subcultivos na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de plantas micropropagadas de morangueiro**. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Agronomia/ Produção Vegetal – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. v. 1, p. 183-260.

LEE, T. S. G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.10, p. 47-55, 1987.

LIMA, G. V. M. **Ação de auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**. 15:473-479, 1962.

PEREIRA, G. A.; CORRÊA, L. de S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande Naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 222-226, out. 2011.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELDS, R.. The toxicity of antibiotics to plant cell culture. **Plant Cell Reports**, v. 2, 1983, p. 36-39.

ROSA, F. C. **Superação de dormência de sementes e cultivo *in vitro* de Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)**. 2009. 52f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

ROSSE, L. N.; VENCOVSKY, R.; FERREIRA, D. F. Comparação de métodos de regressão para avaliar a estabilidade fenotípica em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 25-32, jan. 2002.

SARWAR, M.; SIDDIQUI, S. U. *In vitro* conservation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) germplasm. **Pakistan Journal of Botany**, v.36, n.3, p. 549-556, 2004.

SATO, A. Y. *et al.* Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SILVA, C. M. da *et. al.* **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, jan/dez. 2009.

SOUZA, C. B. L. de. **Cultivo *in vitro* de meristema e micropropagação de plantas de *Piper nigrum* L.** 2015. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal Rural da Amazônia- Ufra, Belém, 2015.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.