

Multiplicação de plântulas de cana-de-açúcar e efeito da inoculação de bactérias diazotróficas durante a fase de enraizamento *in vitro*

Multiplication of sugarcane seedlings and effect of inoculation of diazotrophic bacteria during an in vitro rooting phase

Ester Schiavon Matoso¹, Lorena Donini², Luize Silva Mascarenhas³, Gustavo Waltzer Fehrenbach⁴, Liliâne Silveira Varnes⁵, Sergio Delmar dos Anjos e Silva⁶

Resumo

A cana-de-açúcar é uma cultura de importância nacional e grande interesse econômico para a agricultura. A propagação *in vitro* permite a obtenção de plantas em grande escala, com qualidade sanitária superior e uniformidade, em menor espaço de tempo. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a taxa de multiplicação *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar ao longo de cinco subcultivos, a diferença entre meio de cultura semissólido e líquido na fase de multiplicação e também o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas durante a fase de enraizamento. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado e foram utilizadas as seguintes variedades de cana-de-açúcar: RB867515, RB92579, RB966928, RB975932. Como explante inicial foram utilizados meristemas e para a multiplicação das brotações utilizou-se meio MS 3% acrescido de 7,5 g L⁻¹ de ágar. Paralelamente, foi realizado experimento em Biorreator de Imersão Temporária (BIT), onde foram inoculados explantes oriundos da cultura de meristemas, após o sexto subcultivo. O enraizamento também foi realizado em BIT onde cada frasco recebeu 1L de meio de cultura e 2ml de inoculante contendo 5 espécies de bactérias diazotróficas. Foram avaliados número de brotações e comprimento das plântulas, porcentagem de mudas enraizadas e o desenvolvimento de parte aérea. Os resultados foram submetidos à análise de variância e compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e dos meios de cultura e da inoculação pelo teste t ($p \leq 0,05$). Em relação à taxa de multiplicação, os melhores resultados foram apresentados pela RB975932, com exceção do 4º subcultivo, em que a RB867515 superou as demais. Ao comparar os tipos de meio de cultura, a variedade RB975932 destacou-se em número de brotações em meio líquido e não diferenciou da RB966928 em meio semissólido. Quanto ao comprimento, as variedades RB92579 e RB966928 apresentaram os maiores valores em meio semissólido. No que se refere ao enraizamento, nos tratamentos com inoculação apenas a variedade RB966928 apresentou plântulas enraizadas e sem inoculação todas as variedades emitiram raízes. Portanto, todas as variedades apresentam excelente desenvolvimento *in vitro*, sendo o biorreator de imersão temporária um meio eficiente na fase de multiplicação e enraizamento de

¹Eng^a. Agrônoma, Mestranda e Doutoranda pela UFPel

²Bióloga, Doutora em Ciências pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

³Graduanda do Curso de Biotecnologia pela UFPel

⁴Engenheiro Bioquímico, mestrando na área de Biotecnologia pela UFPel

⁵Graduanda do Curso de Biotecnologia pela UFPel

⁶Eng. Agrônomo, Doutor em Fitotecnia, Pesquisador A da EPACT

plântulas de cana-de-açúcar, no entanto, a inoculação de bactérias diazotróficas é ineficiente quando utilizada nesta fase.

Palavras-chaves: *Saccharum*, cultura de tecidos, biorreator de imersão temporária.

Abstract

Sugarcane is a culture of national importance and economic interest for agriculture. The in vitro propagation techniques allow the obtainment of large amounts of plants, followed by superior sanitary quality and uniformity in a shorter period. Therefore, this research aimed evaluate the in vitro multiplication rate of sugarcane cultivars through five sub cultivations, the difference between semisolid and liquid grow medium at multiplication phase and evaluate the effects of inoculating diazotrophic bacteria during rooting phase. This research was executed at Tissue Culture Laboratory of Embrapa Clima Temperado, using the sugarcane cultivars RB867515, RB92579, RB966928 and RB975932. The meristem of each cultivars was used as explant and MS 3% medium with 7.5 g/L of agar to multiple the sprouts. Meanwhile, an experiment in Temporary Immersion Reactor (TIM) was realized, inoculating explants from meristem culture from sixth day. The rooting was also realized on TIM with 1L of culture medium and 2 mL of inoculum containing five species of diazotrophic bacteria. The number of sprouts, seedlings length, percentage of rooted seedlings and aerial development were evaluated through variance analysis and the variables effects compared using Tukey test ($p \leq 0.05$). The t test ($p \leq 0.05$) was used for the grow medium and inoculation bacteria. In relation with grow tax, the best results were obtained for RB975932 with exception of fourth sub cultivar which RB867515 overcame the others varieties. Comparing the growth media, RB975932 had more sprouts in liquid media and didn't differentiate from RB966928 in semisolid media. The length of RB92579 and RB966928 showed greater values in semi solid media. On the rooting analysis, only the RB966928 developed seedlings in the inoculation treatments. All the others cultivars showed seedling in the absence of bacteria inoculation. Accordingly, all the cultivars demonstrated an excellent in vitro growth. The TIM is an efficient media for multiplication and rooting of sugarcane seedlings, however, the bacteria inoculation is inefficient when used on this phase.

Keywords: *Saccharum*, tissue culture, Temporary immersion bioreactor.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar sempre teve grande importância econômica para a agricultura no Brasil e agora mais ainda graças à utilização do etanol em escala mundial. Devido a isso, atualmente novas variedades estão sendo desenvolvidas e sua disponibilização tem sido acelerada por meio da biotecnologia, através da micropropagação.

A recomendação técnica no cultivo de cana-de-açúcar sugere que 20% do canavial sejam renovados anualmente, para otimização do seu rendimento. Isto significa que 1,8 milhões de ha devem ser renovados, e conseqüentemente gerando uma demanda de 30 milhões de mudas/ano. Um dos gargalos da cadeia de produção sucroalcooleira é a disponibilidade de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, alto rendimento a campo e resistentes a pragas e doenças.

A propagação *in vitro* de plantas oferece vantagens em relação aos outros métodos comumente empregados, dentre elas a propagação de um grande número de plantas em pequeno espaço físico e em um curto espaço de tempo, uniformidade e padronização do lote (mudas idênticas geneticamente), desenvolvimento uniforme, possibilitando a programação do plantio e da colheita. Além disso, as plantas obtidas são livres de pragas e de doenças, garantindo a melhor qualidade da muda, resultando em aumento de produtividade e qualidade do produto (OLIVEIRA et al., 2010).

A contaminação é uma das maiores barreiras para o cultivo *in vitro* de tecidos de plantas, afirmaram Pinho et al. (2012). Sendo assim, a assepsia dos explantes é uma das etapas cruciais da micropropagação, pois é responsável pela eliminação superficial de microrganismos epifíticos e endofíticos antes de sua inoculação no meio nutritivo (SOUZA; JUNGHANS, 2006). Entretanto, além de eliminar os microrganismos patogênicos, também promove a eliminação das bactérias diazotróficas endofíticas (MORAES; TAUK TORNISIELLO, 1997).

Bactérias endofíticas possuem, da mesma forma que patógenos, a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto, vasos condutores e ocasionalmente o meio intracelular (ANDREOTE, 2007), podendo atuar em processos essenciais para o desenvolvimento vegetal, como por exemplo, auxílio na obtenção de nutrientes, promovendo o crescimento vegetal por meio de produção de fitormônios, como auxinas. Auxinas são substâncias que têm em comum a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em culturas de tecidos, principalmente no enraizamento (KRIKORIAN, 1991).

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, como a redução significativa dos custos com mão-de-obra, além de acelerar o ciclo de produção e aumentar a produtividade (TEIXEIRA, 2006).

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a taxa de multiplicação *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar ao longo de cinco subcultivos, a diferença entre meio de cultura semissólido e líquido na fase de multiplicação e também o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas durante a fase de enraizamento.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado (sede), localizado em Pelotas, no Rio Grande do Sul. Foram utilizadas quatro variedades de cana-de-açúcar, sendo elas: RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932.

Para o cultivo *in vitro*, colmos inteiros foram coletados no campo e destes foram retirados os palmitos com aproximadamente cinco centímetros de comprimento. Esses foram submetidos à desinfestação visando eliminar fungos e bactérias, com imersão em álcool 70% por 2 minutos, em hipoclorito de sódio (2%) por 15 minutos, e realizada tríplice lavagem com água deionizada autoclavada, seguindo a metodologia descrita por Dutra et al. (2011).

Posteriormente, em ambiente asséptico, foram extraídos os meristemas com pinças e bisturi enquanto imersos em água autoclavada. Em seguida eles foram inoculados em tubos de ensaio contendo sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionado de hormônios para a multiplicação do material sugeridos por Lee (1987) e 6,0 g L⁻¹ de ágar. Ao extrair os meristemas, tomou-se o cuidado de deixá-los ainda envoltos em alguns discos foliares e de inoculá-los com o ápice virado para baixo, imersos no meio de cultura, para diminuir os riscos de oxidação fenólica. Após cerca de 10 dias os explantes foram trocados de meio, virados e retiraram-se as folhas que se formaram em volta deles. Foram estabelecidos 10 meristemas de cada variedade, que nos novos tubos de ensaio permaneceram por mais 15 dias.

Para a multiplicação das brotações utilizou-se o meio de cultura MS, semissólido, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 mL L⁻¹ de cinetina, 0,2

mL L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 7,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Utilizou-se 30 mL de meio em frascos de 200 mL de volume, onde foram inoculados três explantes. Esses permaneceram em câmara de crescimento sob 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 27 mmol m⁻² s⁻¹ até o momento em que foi feita a próxima repicagem.

Visando multiplicar e quantificar a taxa de multiplicação das variedades de cana-de-açúcar, foi realizado cinco repicagens, em média a cada 20 dias. Durante as repicagens contou-se o número de brotações que cada explante inoculado emitiu, obtendo-se a taxa de multiplicação. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Em contrapartida, foi feita a multiplicação de plântulas de cana-de-açúcar em um biorreator de imersão temporária e para esse fim, foi utilizado o equipamento FOTO-BIT da marca TECNAL com sistema de iluminação de LED integrado.

Antecipando a inoculação dos explantes, os frascos de cultivo do biorreator passaram pelo processo de desinfestação por imersão completa durante 2 minutos em álcool 70% e mais 2 minutos em hipoclorito de sódio (2,5%) e as mangueiras de condução de meio foram autoclavadas a 120°C por 20 minutos.

Em uma das garrafas com capacidade para 5 litros, devidamente desinfestada, foi adicionado 1L de meio de cultura MS líquido e na outra, foram inoculados 20 explantes de aproximadamente cinco centímetros de comprimento e contendo de 3 a 5 folhas. Em seguida os conjuntos de garrafas e mangueiras foram alocados no biorreator e submetidos a diodos emissores de luz (LED) em uma faixa de 70% vermelha e 30% azul (MALUTA et al., 2013). A imersão do meio de cultura foi feita a cada 6 horas, permanecendo por 5 minutos no frasco das plantas, a aeração foi a cada hora e o fotoperíodo foi de 16 horas.

Cada um dos tratamentos contou com três repetições e os explantes eram provenientes da cultura de meristemas e estavam no sexto subcultivo. O material foi mantido por 21 dias no biorreator e ao final deste período avaliou-se o número de brotações e comprimento de plântulas (cm).

Os resultados deste experimento desenvolvido no BIT foram comparados com dados de multiplicação em frascos de 200 mL contendo meio de cultura semissólido, que foram mantidos sob as mesmas faixas de luz do biorreator, com o objetivo de avaliar a diferença entre o meio semissólido e o meio líquido na multiplicação de cana-de-açúcar.

Foram utilizados três repetições para cada variedade e três explantes por repetição. Após 21 dias foi avaliado também o número de brotações e comprimento das plântulas. Os fatores foram arranjos no esquema bifatorial (4 variedades x 2 meios de cultura), os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e dos meios de cultura pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Para o enraizamento das plântulas foram utilizados explantes que estavam no sexto subcultivo e o processo se deu em biorreator de imersão temporária, onde cada frasco recebeu 1L de meio de cultura e 2 mL de inoculante (CANUTO, 2003) contendo bactérias das espécies *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Paraburkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Nitrospirillum amazonense*.

O experimento foi desenvolvido no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo a unidade experimental representada por um frasco contendo 20 explantes. O objetivo do experimento foi testar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas no enraizamento de plântulas de cana-de-açúcar, quando comparado aos tratamentos sem inoculação.

Após 20 dias em biorreator os tratamentos foram avaliados quanto à percentagem de mudas enraizadas e desenvolvimento de parte aérea. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e da inoculação pelo teste t ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao comparar as taxas de multiplicação das variedades de cana-de-açúcar ao longo de cinco subcultivos, através da contagem do número de brotos emitidos por cada explante (Tabela 1), puderam-se observar diferenças entre os materiais em

todas as avaliações. Os melhores resultados foram apresentados pela RB975932, com exceção do 4º subcultivo, em que a RB867515 superou as demais. Ao mesmo tempo em que a RB92579 apresentou as menores taxas de multiplicação em todas as avaliações, assim como a RB966928 nos subcultivos 1 e 5.

Tabela 1 - Número de brotações de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*, de quatro variedades e número de explantes obtidos ao final de cinco subcultivos^{1/}.

Variedade	Número de meristemas	Subcultivo					Explantes obtidos
		1º	2º	3º	4º	5º	
RB867515	1	3,5 b	5,0 c	7,0 c	10,0 a	8,5 b	10.412*
RB92579	1	3,0 c	3,0 d	4,0 d	6,0 d	7,0 c	1.512*
RB966928	1	3,0 c	6,0 b	8,0 b	9,0 b	7,0 c	9.072*
RB975932	1	4,5 a	7,5 a	10,0 a	8,0 c	10,0 a	27.000*

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando as variedades em cada um dos subcultivos.

*Valores estimados

A constituição base do meio de cultura, o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento são fatores determinantes para a obtenção de altas taxas de multiplicação, mas o genótipo também tem grande influência. A variedade RB975932 é conhecida pelo seu excelente perfilhamento (CHAPOLA, 2013), o que justifica seu desempenho na brotação dos explantes. A RB92579 também possui bom perfilhamento (FRANZÉ et al., 2014), no entanto, quando cultivada *in vitro* apresenta plântulas alongadas e com pouco desenvolvimento lateral.

Observou-se também que na primeira repicagem todas as variedades apresentaram poucas brotações, o que aumentou nas próximas repicagens. O aumento no número de subcultivos *in vitro* resulta em maior produção de brotações e também em melhor qualidade do material (GOMIDE, 2004).

O número de explantes que foram obtidos ao final dos subcultivos, ou seja, após as cinco repicagens de um único meristema, é um resultado bastante promissor. Tendo em vista que, há a possibilidade de formar um hectare de cana-de-açúcar utilizando menos de 10 mil mudas (AFERRI; XAVIER; PEREIRA, 2016).

Durante o sexto subcultivo, as plântulas de cana-de-açúcar foram multiplicadas em biorreator de imersão temporária e também em frascos contendo meio de cultura semissólido, ambos em condições de luminosidade ideais para a

multiplicação. Maluta et al. (2013) afirmam que 70% de luz vermelha e 30% de azul evitam a formação de plântulas estioladas, induzindo dessa forma, a brotação lateral das mesmas.

Foi realizada uma única avaliação das plântulas e para ambos os parâmetros ocorreu interação bifatorial entre os fatores (variedade x meio de cultura), com isso os efeitos isolados foram desconsiderados e analisaram-se detalhadamente as interações (Tabela 2).

Em relação ao número de brotações, no biorreator de imersão temporária com meio líquido, a variedade RB975932 apresentou melhor desenvolvimento, enquanto que a RB966928 emitiu o menor número de brotos. No entanto, quando cultivadas de forma convencional em meio semissólido, essas variedades não diferenciaram entre si, apresentando as melhores taxas de multiplicação. A RB966928 se desenvolveu melhor em meio semissólido e as demais no biorreator.

Quanto ao comprimento, todas as variedades apresentaram plântulas mais longas no meio semissólido. Nesse tipo de meio a RB92579 e a RB966928 apresentaram os maiores comprimentos e no líquido apenas a última.

Tabela 2 - Número de brotações e comprimento (cm) de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* no sexto subcultivo, em função das variedades e dos tipos de meio de cultura^{1/}.

Variedade	Número de brotações		Comprimento de plântula (cm)	
	Líquido	Semissólido	Líquido	Semissólido
RB867515	10,5 bA	4,5 bB	4,4 bB	7,3 bA
RB92579	8,0 cA	4,0 bB	4,2 bB	10,3 aA
RB966928	4,0 dB	6,6 aA	7,0 aB	9,7 aA
RB975932	14,0 aA	7,5 aB	5,0 bB	7,5 bA
CV (%)	9,9		7,3	

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, respectivamente, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando as variedades dentro de cada tipo de meio de cultura e pelo teste t ($p \leq 0,05$) quando comparado o tipo de meio dentro de cada variedade.

Estes resultados confirmam a importância da utilização do meio de cultivo adequado para a cultura de interesse. Para a cana-de-açúcar indicam-se meios semissólidos para o estabelecimento e meios líquidos para a etapa de multiplicação (FRANCA, 2016). O biorreator possibilita a renovação do ar durante o cultivo e o monitoramento de oxigênio dissolvido, pH, concentração de íons e temperatura

(TEIXEIRA, 2002), além da agitação da cultura e maior contato dessa com o meio de cultivo, o que resulta na perda de dominância apical e proporciona o desenvolvimento de maior número de brotações nos explantes (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

Aos 30 dias avaliou-se as condições das plântulas submetidas à inoculação de bactérias e a média de plântulas enraizadas foi de 90% nas variedades RB867515, RB92579 e RB966928 e 80% na RB975932 sem inoculação de bactérias diazotróficas. Nos tratamentos em que houve a inoculação apenas a RB966928 apresentou mudas enraizadas, em uma média de 20%. Nestes mesmos tratamentos, o crescimento das plântulas foi bastante inferior aos controles sem inoculação. Não houve multiplicação das brotações e as plântulas apresentaram estiolamento (Figura 1).

Acredita-se que nos tratamentos onde foi efetuada a inoculação, ocorreu a ligação das bactérias diazotróficas ao meio de cultura líquido. E com isso, a quantidade de nutrientes diminuiu e as plântulas não tiveram condições de se desenvolver. Estes resultados apontam que durante o enraizamento em biorreator de imersão temporária não é um bom momento para a inoculação. Até mesmo porque, o interesse dessa prática na fase de enraizamento, é proporcionar um aumento na emissão de raízes, o que ocorreu nas plântulas que não foram inoculadas.

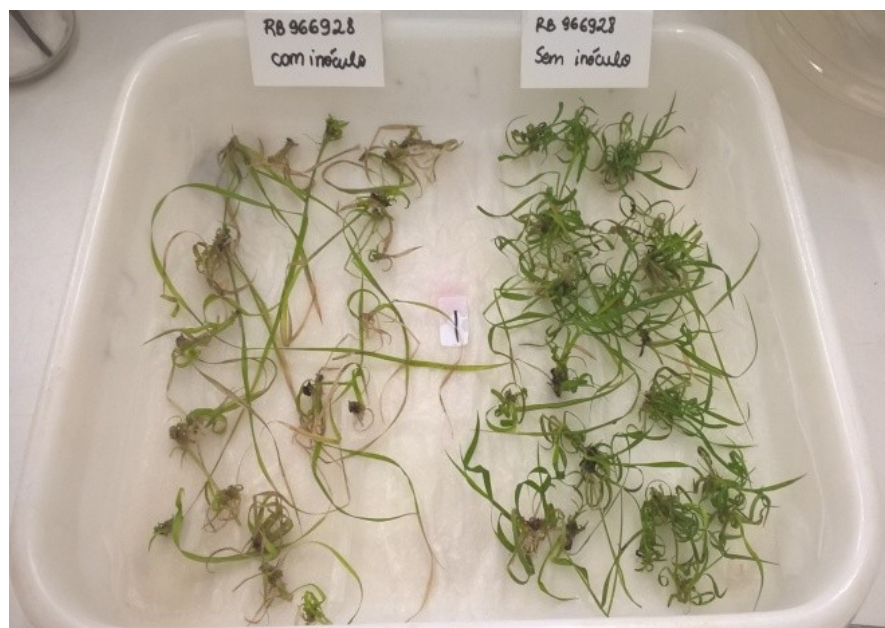


Figura 1 - Aparência das plântulas de cana-de-açúcar com (à esquerda) e sem inoculação de bactérias diazotróficas (à direita), após retirada do biorreator.

No entanto, a reintrodução de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar tem auxiliado os estudos da associação entre as plantas e as bactérias diazotróficas, e tem permitido avaliar o potencial de fixação biológica de nitrogênio e de promoção de crescimento devidos à inoculação destas bactérias (REIS et al, 1999; OLIVEIRA et al., 2002; CANUTO et al.; 2003; SCHULTZ et al., 2012). Os autores Muñoz-Rojas; Caballero-Mellado (2003), em um experimento de curta duração, constataram que a inoculação de estirpes bacterianas proporcionou maiores ganhos na parte aérea e sistema radicular de mudas micropropagadas, porém, em frascos contendo meio semissólido.

CONCLUSÕES

As variedades RB867515 e RB975932 apresentam excelente desenvolvimento *in vitro*, tanto em meio de cultura semissólido, quanto em líquido, enquanto que a RB92579 se desenvolve melhor em semissólido e a RB966928 em líquido.

O biorreator de imersão temporária é um meio eficiente de micropropagação de mudas de cana-de-açúcar.

A inoculação de bactérias diazotróficas é ineficiente quando utilizada na fase de enraizamento de plântulas em biorreator.

REFERÊNCIAS

AFERRI, G.; XAVIER, M. A.; PEREIRA, M. A. A. Custo de produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar – MPB. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 13, n. 2, 2016.

ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 184 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

CANUTO, E. de L.; SALLES, J. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; PERIN, L. REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agromonia**, v. 37, nº 2, p. 67 - 72, 2003.

CHAPOLA, R. G. **Censo varietal, Variedades e Clones Potenciais RB Recomendações de Uso**. PMGCA/RIDES/UFSCar. 88p. 2013.

DUTRA, L. F.; DONINI, L. P.; SILVA, S. D. A. E.; SILVA, N. D. G.; THIEL, F. B.; VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M. **Protocolo de micropropagação de cana-de-açúcar**. Embrapa Clima Temperado. Rio Grande do Sul, 2011.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. **A micropropagação de Eucalipto**. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58, p. 49-59, 2009.

FRANCA, M. A. **Micropropagação de cana-de-açúcar cultivar RB966928**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. 64f. Curitiba, 2016.

FRANZÉ, R. V.; TEZORE, J. V.; QUEIROZ, A. L. P.; VESCOVE, H. V.; MADALENO, L. L. Perfilamento em cana-de-açúcar sob diferentes manejos hídricos. **Anais... II Simpósio de Tecnologia Sucoenergética e de Biocombustíveis**. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal, v. 6, p. 89-94, 2014.

GOMIDE, D. W. G. **Influência do número de subcultivos na multiplicação in vitro e na aclimatização de plantas micropropagadas de morangueiro**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Passo Fundo. 93p. 2004.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.41-77.

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

MALUTA, F. A.; BORDIGNON, S. R.; ROSSI, M. L.; AMBROSANO, G. M. B.; RODRIGUES, P. H. V. Cultivo in vitro de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n. 9, p. 1303-1307, 2013.

MORAES, V. A; TAUK-TORNISIELO, S. M. **Efeito da inoculação de *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) variedade SP70-1143, a partir de cultura de meristemas**. Anais... XIX Congresso Brasileiro de microbiologia. Rio de Janeiro, 1997. 215 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant Soil**, v.242, n.2, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, G.; ANDRADE, L. F. Bactérias **Endofíticas**. Universidade Estadual de Montes Claros, Fisiologia das Plantas Cultivadas. Janaúba – MG, 2010.

OLIVEIRA, M. L. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, 39, n. 91, p. 309-315, 2011.

PINHO, K. da C. **Esterilização química de meio de cultura para micropropagação de cana-de-açúcar [*Saccharum* spp.]**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia. Campos de Goytacazes – RJ, 2012. 48 p.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS, Jr., F. B.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and soil**, v. 206, p. 205–211, 1999.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R.F.; SILVA, J.A.; BAPTISTA, R.B.; OLIVEIRA, R.P.; LEITE, J.M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JR.; J.B.; ALVES, B.J.R.; BALDANI, J.I.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.2, p. 261-268, fev., 2012.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

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

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores: Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais - Produção de mudas em larga escala. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº24, p. 36-41. 2002.